



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Malária por *Plasmodium falciparum* em Angola: estudos  
genéticos associados a combinações terapêuticas à base de  
artemisinina**

**Kinanga Kiaco**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR  
EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
ESPECIALIDADE PARASITOLOGIA**

**JANEIRO, 2018**



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Malária por *Plasmodium falciparum* em Angola: estudos  
genéticos associados a combinações terapêuticas à base de  
artemisinina**

**Autor: Kinanga Kiaco**

**Orientador: Doutora Dinora Lopes**

**Coorientador: Professor Doutor Virgílio do Rosário**

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutor em Ciências Biomédicas

Apoio financeiro de Estado Maior General das Forças Armadas Angolanas

A partir do conjunto de resultados, obtidos neste trabalho e apresentados nesta dissertação, foram publicados os seguintes artigos científicos:

- 1- Evaluation of artemether-lumefantrine efficacy in the treatment of uncomplicated malaria and its association with pfmdr1, pfatpase6 and K13-propeller polymorphisms in Luanda, Angola. Kiaco K, Teixeira J, Machado M, do Rosário V, Lopes D. Malar J. 2015 Dec 16;14:504. doi: 10.1186/s12936-015-1018-3
- 2- The drug transporter ABCB1 c.3435C>T SNP influences artemether-lumefantrine treatment outcome. Kiaco K, Rodrigues AS, do Rosário V, Gil JP, Lopes D. Malar J. 2017 Sep 21;16(1):383. doi: 10.1186/s12936-017-2006-6.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi realizado no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais LA (IHMT), com apoio financeiro do Estado Maior General das Forças Armadas Angolanas sob forma de bolsa de estudo. A sua realização contou fundamentalmente com o apoio e colaboração de diversas pessoas, às quais aqui expresso os meus sinceros agradecimentos:

Aos pacientes e pais ou tutores das crianças incluídos no estudo pela valiosa colaboração.

À Doutora Dinora Lopes, minha orientadora, pelo desempenho e dedicação demonstrada na orientação técnica e metodológica, que contribuiu de forma fundamental a tornar possível a realização das atividades do meu Doutoramento.

Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário, Professor Catedrático do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstrou como coorientador, no acompanhamento técnico e didático deste trabalho.

Ao Tenente General Aires Africano, ao Tenente General Alberto d'Almeida e ao Tenente General Alcibiades Chindombe das Forças Armadas Angolanas, bem como ao Professor Doutor Filomeno Fortes do Programa de Controlo de Malária em Angola, pelo apoio que me proporcionaram em momentos de necessidade.

Ao Professor Doutor Paulo Ferrinho, Diretor do IHMT e à Professora Doutora Lenea Campino, Presidente do Conselho Científico do IHMT, pela compreensão demonstrada, particularmente no que concerne os períodos de necessidade de paragem de atividades devido ao envolvimento em projetos da OMS.

Ao Professor Doutor Sebastião Rodrigues, pela disponibilidade na qualidade de membro da comissão tutorial, e ao Professor Doutor José Pedro Gil do Instituto Karolinska, Suécia, pelo apoio técnico e científico, o qual foi fundamental para a melhoria da qualidade do presente trabalho.

Ao Senhor Padre Fernando Tchilunda, à Doutora Vanda L, pelo valioso apoio que o estudo beneficiou ao nível do Hospital Divina Providência.

Ao Professor Doutor José Nogueira da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, por ter autorizado a utilização do laboratório para o processamento das amostras com a técnica de HPLC.

À Joana Teixeira, pela participação ativa nos trabalhos de laboratório.

Ao pessoal técnico envolvido no estudo, nomeadamente, Pedro Mbanzulu, Manuel Teca, as Irmãs Bernarda e Martinha, pelo apoio tão útil prestado no que concerne o atendimento dos pacientes, colheita de amostras e trabalhos laboratoriais.

À Mestre Ana Catarina Alves e à Senhora Celeste Figueiredo do GHTM, pelo valioso apoio pessoal em várias situações.

Ao Coronel Teca e ao Tenente Coronel Gerónimo Barbosa, da Direção Principal de Ensino das Forças Armadas Angolanas, pelo apoio tão útil associado aos processos administrativos.

Aos colegas Elsa Fortes, Rafael Dimbu, Pedro Vandunem e Nilton Saraiva, pelo apoio a nível de trabalho e disponibilidade sempre demonstrado.

Ao Doutor Sidu Biai e ao Engenheiro Badjana Nelson da OMS Guiné Bissau, pelo apoio beneficiado aos momentos de necessidade.

Aos meus Pais, a quem expresso os meus agradecimentos, por me terem proporcionado amor, educação, apoio material e incentivo para aprendizagem e, que faleceram dez anos depois da minha licenciatura em medicina, sem me terem visto como médico, por causa da guerra.

À Alice dos Santos, Luísa dos Santos Kinanga e Ana Mónica dos Santos Kinanga, pelo sacrifício, apoio e o encorajamento nos bons e maus momentos.

## Resumo

A falência terapêutica aos antimaláricos constitui um problema relevante para os pacientes, um obstáculo e desafio para os programas de controlo da malária.

Com base nos estudos de eficácia terapêutica e de acordo com as recomendações da OMS, em 2006, Angola substituiu a cloroquina pela combinação Artemeter + Lumefantrina (AL) como fármaco de 1ª linha, no tratamento de malária não complicada.

Sendo a falência terapêutica uma ocorrência multifatorial, realizamos um estudo integrado, que incluiu fatores inerentes ao parasita e, os associados à metabolização de fármacos no hospedeiro humano.

Foram incluídos 103 pacientes com malária não complicada, selecionados entre 2011 e 2013, tratados com AL, seguidos durante 28 dias, de acordo com o protocolo da OMS para o estudo de eficácia terapêutica e colhidas amostras de sangue para exames moleculares e HPLC.

A extração de DNA das amostras sanguíneas em papel de filtro foi realizada com Fenol-Clorofórmio. A identificação de espécies de *Plasmodium* e a genotipagem do *pfmsp2* foram efetuadas por Nested-PCR; os polimorfismos nos genes *pfmdr1* e *pfatp6* de *P. falciparum* e os SNPs em genes das famílias *MDR1* e *CYP450* no hospedeiro humano foram analisados por PCR-RFLP e RT-PCR, tendo os SNP's do *pfK13* sido processados por sequenciação.

A taxa de cura foi de 91,3%; 12,6% (n = 13) dos 103 pacientes apresentavam parasitémia no D3; 73,4% das amostras eram portadoras do alelo selvagem *pfmdr1* 86N, tendo o alelo mutante *pfmdr1*-1246Y sido identificado em apenas uma amostra; 11% das amostras apresentaram aumento do número de cópias do *pfmdr1*; não foram identificadas amostras portadoras de mutação no SNP 769 do gene *pfatp6*, nem de mutações nos codões estudados do gene *pfK13*.

Relativamente aos polimorfismos nos genes do hospedeiro humano, as variantes que codificam para proteínas de atividade alterada apresentaram as seguintes frequências: *MDR1* 3435TT (6,9%), *MDR1* 129CC (1%); *CYP1A1* \* 2B (0%); *CYP2C8* \* 2 (4%), *CYP2C8* \* 3 (0%); *CYP3A4* \* 1B (54,5%) e *CYP3A5* \* 3 (4,85%).

Os resultados deste estudo sugerem uma alteração do perfil do *P. falciparum* no que concerne a genética e à suscetibilidade à Artemeter + Lumefantrina em comparação com os dados de 2004; a resposta clínica após tratamento com AL não foi associado com os SNPs analisados no parasita; a taxa de falência encontrada (8.7%) não justificam uma mudança de política terapêutica do país, de acordo com as diretrizes da OMS, mas reforçam a necessidade de uma monitorização regular do fármaco.

Em relação aos polimorfismos em genes humanos, os SNP's analisados apresentaram frequências alélicas semelhantes às reportadas noutros estudos em populações africanas. Não foram observadas associações significativas entre os SNP's analisados nos genes *CYP3A4/5* e a resposta terapêutica à AL; no entanto, foi observada uma associação significativa entre a variante mutante *ABC1* 3435TT e pacientes com parasitémia recrudescente no período de tratamento, o que sugere um envolvimento deste transportador na resposta ao tratamento com Artemeter + Lumefantrina.

Foram constatadas frequências relevantes das variantes alélicas dos genes *CYP1B1* e *CYP2C8*, com atividade enzimática associada à lenta metabolização da amodiaquina, o que sugere a existência na população analisada, de risco de efeitos adversos ao tratamento contendo amodiaquina.

Palavras-chave: Resposta terapêutica, *Plasmodium falciparum*, polimorfismos, ACT, farmacogenética.

## Abstract

Antimalarials therapeutic failure is a relevant problem for patients, an obstacle and challenge to the malaria control programs.

Based on therapeutic efficacy studies and in accordance with WHO recommendations, in 2006, Angola replaced chloroquine by Artemether + Lumefantrine (AL) combination as first line drug for the malaria uncomplicated treatment.

Considering the therapeutic failure as a multifactorial event, we developed an integrated study, which includes factors inherent to the parasite susceptibility as well as those associated with the metabolism of drugs in the human host.

103 patients with uncomplicated malaria were include between 2011 and 2013, treated with Artemether + Lumefantrine, followed for 28 days, according to the WHO Protocol for the therapeutic efficacy study and blood samples were collected for molecular analyses and HPLC.

DNA extraction from blood samples on filter paper was processed by Phenol-Chloroform method. *Plasmodium* species identification and *pfmsp2* genotyping were performed by Nested-PCR; polymorphisms in the *pfmdr1* and *pfatp6* of malaria *P. falciparum* genes and those in *CYP450* and *MDR1* families genes of the human host was analyzed by RFLP-PCR and RT-PCR and the *pfK13* SNP's were performed by sequencing.

The cure rate was 91.3%; 12.6% (n = 13) of 103 patients had parasitemia in the D3. The wild type *pfmdr1* 86N allele was found in 73.4% of the samples; mutant *pfmdr1*-1246Y was identified in only one sample; 11% of samples showed an increase in the *pfmdr1* number of copies. No samples had mutation in the 769 SNP of the *pfatp6* gene, as well as in the studied codons of the *pfK13* gene.

Regarding to the human host genetic polymorphisms, the allelic variants encoding for proteins with altered activity showed the following frequencies: *MDR1* 3435TT (6,9%), *MDR1* 129CC (1%); *CYP1A1* \* 2B (0%); *CYP2C8* \* 2 (4%), *CYP2C8* \* 3 (0%); *CYP3A4* \* 1B (54,5%) e *CYP3A5* \* 3 (4,85%).

The results of this study suggest some change of the *P. falciparum* regarding the susceptibility to AL combination and to the genetics profile in comparison with 2004 data.

The clinical outcome after AL treatment was not associated with any allelic status of the analyzed SNPs of the parasite; the failure rate found (8.7%) do not justify a therapeutic policy change according to WHO guidelines, but reinforce the need for regular drug monitoring.

In relation to the human host genetics, the analyzed SNP's displayed allele frequencies similar to those usually reported in other studies in African populations. No significant associations were detected between the analyzed SNP's of CYP3A4/5 genes and AL treatment outcomes; however, it was observed a significant association between carriers of the *ABCI* 3435TT mutant variant and malaria recrudescence, which suggests some involvement of this allele in the AL treatment response.

There were observed relevant frequencies of mutant variants of *CYP1B1* and *CYP2C8* genes encoding to enzymes associated with low metabolizing activity for amodiaquine, that suggests the existence in the studied population a potential risk of adverse effects to treatment containing amodiaquine.

Key words: Therapeutic response, *Plasmodium Falciparum*, Polymorphisms, ACT, Pharmacogenetics.

## ÍNDICE

I – Introdução	14
I.1. Situação atual de malária	15
I.2. Epidemiologia da malária	16
I.2.1. Agente etiológico	16
I.2.1.1. Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro humano	16
I.2.1.2. Ciclo do plasmódio no hospedeiro invertebrado – mosquito	20
I.2.2. O hospedeiro humano	20
I.2.2.1. Mecanismos de defesa do organismo contra o <i>Plasmodium</i>	20
I.2.2.1.1. Imunidade inata	21
I.2.2.1.2. Imunidade adquirida	21
I.2.3. O vetor da malária	22
I.2.3.2. Mosquitos vetores de malária	23
I.2.3. Distribuição da malária no mundo	23
I.2.3.1. Fatores que influenciam a distribuição da malária	25
I.3. Aspectos clínicos	28
I.3.1. Infecção por <i>Plasmodium</i>	28
I.3.2. Patogénese da Malária	28
I.3.3. Quadro clínico da malária	29
I.3.3.1. Malária não complicada	29
I.3.3.2. Malária grave ou complicada	30
I.3.4. Diagnóstico da malária	31
I.3.4.1. Microscopia	31
I.3.4.2. Testes rápidos de diagnóstico (TRD's)	32
I.3.4.3. Outros métodos de diagnóstico	32
I.3.4.3.1. Técnicas de fluorescência	32
I.3.4.3.2. Testes sorológicos	33
I.3.4.3.3. Estudos moleculares	33
I.3.5. Tratamento da malária	34
I.3.5.1. Tratamento da malária não complicada	34
I.3.5.2.2. Tratamento de malária grave e complicada	34
I.3.5.3. Tratamento presuntivo intermitente (TIP)	34
I.3.5.4. Tratamento profilático da malária	35
I.3.5.5. Tratamento de infecção assintomática de malária	35
I.3.6. Fármacos antimaláricos	35
I.3.6.1. Classificação de antimaláricos	35
I.3.6.2. Fármacos utilizados em combinações terapêuticas a base de artemisinina	38
I.3.6.2.1. Artemisinina	38
I.3.6.2.2. Artemeter	39
I.3.6.2.3. Lumefantrina (LUM)	39
I.4. Metabolismo de fármacos e xenobióticos	41
I.4.1. Reações de fase I do metabolismo	41
I.3.5.3. Falência terapêutica aos antimaláricos	43
I.4. Genética associada à terapia antimalárica	44
I.4.1. Polimorfismos em genes do parasita da malária	44



I.4.1.1. Resistência do <i>Plasmodium</i> aos antimaláricos	44
I.4.1.1.1. Emergência e propagação da resistência	45
I.4.1.1.2. Base genética da resistência do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos	46
I.4.1.1.3. Marcadores moleculares de resistência do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos	47
I.4.1.1.3.1. <i>Pfmdr1</i> ( <i>P. falciparum</i> multidrug resistant)	47
I.4.1.1.3.2. <i>PfATPase6</i>	48
I.4.1.1.3.3. <i>pfK13-propeller</i>	49
I.4.2. Polimorfismos em genes do hospedeiro humano	49
I.4.2.1. Marcadores moleculares associados ao metabolismo de fármacos	50
I.4.2.1.1. SNP's em genes da superfamília Citocromo P450 ( <i>CYP</i> )	50
I.4.2.1.1.1. <i>CYP1A1</i>	51
I.4.2.1.1.2. <i>CYP1B1</i>	52
I.4.2.1.1.3. <i>CYP2C8</i>	53
I.4.2.1.1.4. <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i>	54
I.4.2.1.2. SNP's em genes da superfamília ABC1 / MDR1	57
I.4.2.1.2.1. Proteínas transportadoras de membrana	57
I.4.2.1.2.1.1. MDR1 ( <i>multi drug resistance</i> )	57
I.5. Malária em Angola	59
I.6. Objetivo Geral	63
I.6.1. Objetivos Específicos	63
II. Material e métodos	64
II.1. Material	65
II.1.1. Material biológico	65
II.2. Considerações Éticas	66
II.3. Estudo da resposta terapêutica à combinação AL	67
II.3.1. Cálculo do tamanho da amostragem	67
II.3.2. Análise estatística	67
II.3.3. População de estudo	67
II.3.3.1. Locais de colheita	67
II.3.3. 2. Seleção de Pacientes	68
II.3.3. 2.1. Critérios de exclusão do estudo	68
II.3.3. 2.2. Critérios de inclusão no estudo	68
II.3.4. Colheita de amostras	69
II.3.5. Classificação da resposta terapêutica	70
II.6. Estudos moleculares	72
II.6.1. Extração de DNA a partir de sangue em papel de filtro	72
II.6.1.1. Método de fenol-clorofórmio	72
II.6.1.2. Método com Chelex	73
II.6.2. Prevalência de polimorfismos do parasita e sua associação à resposta ao Coartem®	73
II.6.2.1. PCR para identificação de espécies de <i>Plasmodium</i>	73
II.6.2.2. Identificação de polimorfismos no gene <i>pfmsp2</i> por PCR	75
II.6.2.3. PCR-RFLP para determinação da frequência de polimorfismos em genes do <i>P. falciparum</i>	77
II.6.2.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose	79
II.6.2.5. Avaliação do número de cópias do <i>pfmdr1</i> por PCR em tempo real	80
II.6.2.6. Determinação de polimorfismos no <i>pfK13</i> por sequenciação	81
II.6.2.7. Polimorfismos em genes do hospedeiro humano, envolvidos no transporte e metabolização de fármacos	82
II.6.3. Doseamento de antimaláricos (AL) por HPLC	84

II.6.3.1. Extração da lumefantrina das amostras de sangue total em papel de filtro	85
II.6.3.1.1. – Validade analítica dos métodos	85
II.6.3.1.2. Otimização das condições cromatográficas	86
III. Resultados	87
III.1. Eficiência terapêutica da combinação artemeter-lumefantrina	88
III.1.1. Pacientes incluídos	88
III.1.2. Detecção do <i>P. falciparum</i> por MO	88
III.1.3. Detecção do <i>Plasmodium falciparum</i> por PCR	89
III.1.4. Detecção de gametócitos	89
III.1.5. Evolução do quadro febril	91
III.1.6. Classificação da resposta terapêutica	91
III.2. Análise de polimorfismos em genes de <i>P. falciparum</i>	92
III.2.1. Genotipagem do <i>pfmsp2</i>	92
III.2.2. Marcadores moleculares de resistência do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos	93
III.2.2.1. SNP's N86Y e D1246Y do gene <i>pfmdr1</i>	93
III.2.2.2. Amplificação do gene <i>pfmdr1</i>	94
III.2.2.3. Polimorfismo S769N no gene <i>pfATP6</i>	94
III.2.2.4. Polimorfismos no gene <i>pfK13-propeller</i>	95
III.3. Análise de polimorfismos em genes do hospedeiro humano	97
III.3.1. Genes <i>CYP1A1</i> e <i>CYP1B1</i>	97
III.3.2. Gene <i>CYP2C8</i>	97
III.3.3. Genes <i>CYP3A4</i>	98
III.3.4. Genes <i>CYP3A5</i>	99
III.3.5. Gene <i>MDR1/ABCB1</i>	99
III.4. Doseamento dos antimaláricos AL	102
IV. Discussão	103
IV.1. Identificação do <i>P. falciparum</i>	104
IV.1.2. Detecção de gametócitos	105
IV.2. Resultados terapêuticos ao tratamento com a combinação AL	105
IV.3. Análise dos polimorfismos em genes do <i>P. falciparum</i>	107
IV.3.1. <i>pfmsp2</i> (proteína de superfície do merozoito)	107
IV.3.2.1. SNP's N86Y e D1246Y do gene <i>pfmdr1</i>	108
IV.3.2.2. Avaliação do número de cópias do gene <i>pfmdr1</i>	110
IV.3.2.3. Análise do SNP S769N do gene <i>pfATPase6</i>	111
IV.3.2.4. Análise de polimorfismos no gene <i>pfK13-propeller</i>	112
IV.4. Polimorfismos em genes do hospedeiro humano	113
IV.4.1. Frequências genotípicas dos genes <i>CYP1A1</i> , <i>CYP1B1</i> e <i>CYP2C8</i>	114
IV.4.2. Frequência genotípica dos genes <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i>	115
IV.4.3. Frequência genotípica no <i>ABCB1/MDR1</i>	116
IV.4. Associação entre os SNP's de humano analisados e a resposta ao tratamento com AL	117
V. Considerações Finais	120
VI. Referências Bibliográficas	122
VII. Glossário	131
VIII. Anexos	134

## Lista de Abreviaturas, siglas ou acrónimos

$\Delta$  - Variação ou diferença

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{l}$  - microlitro

A - Adenina

a.a. - aminoácido

ABC – Região de ligação ao ATP (*ATP binding cassette*)

ACT – Combinações Terapêuticas baseadas em Artemisinina

AL - artemeter-lumefantrina

AMQ – Amodiaquina

HAP - arila e aminas heterocíclicos,

ATP - adenosina trifosfato

bp – Pares de bases

C - Citosina

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

$\text{CO}_2$  - dióxido de carbono

CQ – Cloroquina

Ct – *Threshold cycle* (ciclo onde ocorre um aumento significativo da fluorescência emitida)

Chr. – Cromossoma

CYP - Citocromo P450

DEAQ - desethylamodiaquine

df – grau de liberdade estatístico

DHA - dihidroartemisinina

DLF - desbutil-lumefantrina

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease I

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfato

dp – Desvio padrão

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FP-XI – ferriprotoporfirina IX

G - Guanina

h - Hora

IC – Concentração inibitória  
 IC50 – dose que inibe 50% dos parasitas  
 iRBC - *infected red blood clearance* (eliminação dos eritrócitos infectados)  
 IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
 Kb -kilo base  
 kDa – Kilo Dalton  
 MDR – *Multi Drug Resistance*  
 mg - miligrama  
 min – Minuto  
 ml – mililitro  
 MO - microscopia ótica  
 MQ – Mefloquina  
 mRNA - ácido ribonucleico mensageiro  
 nM - nano molar  
*Locus* - local fixo num cromossomo onde está localizado determinado gene ou marcador genético (plural de *locus* é *loci*)  
 LUM - Lumefantrina  
 $O_2^-$  - radical superóxido  
 °C - graus centígrados  
 OH - radical hidroxilo  
 OMS – Organização Mundial de Saúde  
 p/v – peso/ volume  
 pb - pares de bases  
 PBS – tampão fosfato  
 PCR – Reação de polimerização em cadeia (*Polimerase Chain Reaction*)  
 PCR-RFLP – *Polimerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism*  
*pfβ-actin1* – Gene *Plasmodium falciparum β actin1*  
*pfmdr1* – Gene *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1*  
*pfmsp2* – gene *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2  
 Pgh1 – Proteína *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1*  
 QN – Quinino  
 R – Resistente  
 RSA – *Ring-stage Survival Assay*  
 RNA - ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

RT PCR – *Real time – polymerase chain reaction*

S – Sensível

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

T - Timidina

TBE – Tampão constituído por Tris, ácido bórico e EDTA

TE – Tampão de eluição constituído por Tris EDTA

TRD - Testes rápidos de diagnóstico

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

U – Unidades

UEI – Unidade de Investigação e Ensino

UNL – Universidade Nova de Lisboa

UV – ultravioleta

WT – wild type ou tipo selvagem

V – Volt

V/V – volume/volume

## **I – INTRODUÇÃO**

### **I.1. Situação atual de malária**

A malária é uma doença, causada por protozoários do género *Plasmodium*, um parasita intracelular que se transmite por picada do mosquito fêmea do género *Anopheles* [1].

Esta doença constitui a maior causa de morbilidade nos países onde é endémica. De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2016, cerca de 3,2 bilhões de pessoas vivem em áreas onde ocorre o risco de transmissão da malária; foi registada uma média de 216 milhões de casos e 445.000 de óbitos por malária, dos quais cerca de 90% ocorreram na região Africana [2].

Devido à ausência de uma vacina viável, as principais estratégias para o combate à doença, atualmente, são baseadas no controlo da exposição do hospedeiro humano ao vetor e ao agente causal, no diagnóstico precoce e tratamento atempado com antimaláricos eficazes e seguros [3, 4]. No entanto, ao tratamento da malária estão associadas algumas dificuldades, nomeadamente o número limitado de antimaláricos eficazes disponíveis, os quais têm ação específica para cada fase morfológica do plasmódio e a tendência do parasita para desenvolver resistência aos fármacos [5]. Estes fatos implicam a necessidade de se adotar políticas racionais de tratamento da doença, adaptadas à situação específica de cada país [4].

O sucesso dos programas de tratamento da malária depende de diversos fatores, tais como o tipo de regime terapêutico adotado, a disponibilidade de medicamentos antimaláricos de qualidade e a aderência da população aos regimes de tratamento e de prevenção [5].

Outros aspetos pertinentes para o sucesso do tratamento da malária incluem fatores genéticos associados à suscetibilidade e resistência do parasita aos antimaláricos [6] e à metabolização dos fármacos pelo hospedeiro humano [7].

No âmbito do controlo da malária, a OMS recomenda o uso de combinações terapêuticas à base de artemisinina (ACT) e a realização de estudos para monitorização da resposta terapêutica dos antimaláricos de primeira linha [8]. Estas diretrizes têm como objetivo confirmar a sua eficácia, detetar precocemente falências terapêuticas e eventualmente a resistência do parasita aos antimaláricos, no entanto, não se encontram estabelecidas normas formais associados ao controlo do metabolismo dos antimaláricos pelo paciente [8].

## I.2. Epidemiologia da malária

A transmissão e manutenção da malária na população resultam da interação entre quatro componentes principais: a) o agente etiológico (*Plasmodium*); b) o hospedeiro vertebrado; c) o hospedeiro invertebrado (mosquito/vetor) e d) o meio ambiente [1].

### I.2.1. Agente etiológico

Os parasitas causadores de malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao género *Plasmodium* (*P.*). Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, apenas cinco espécies infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e, no sudeste Asiático, o parasita responsável pela malária de macacos, *P. knowlesi*, cuja identificação só é garantida por métodos moleculares. A maioria das mortes em humanos, causada pela malária, deve-se ao *P. falciparum* [1, 9].

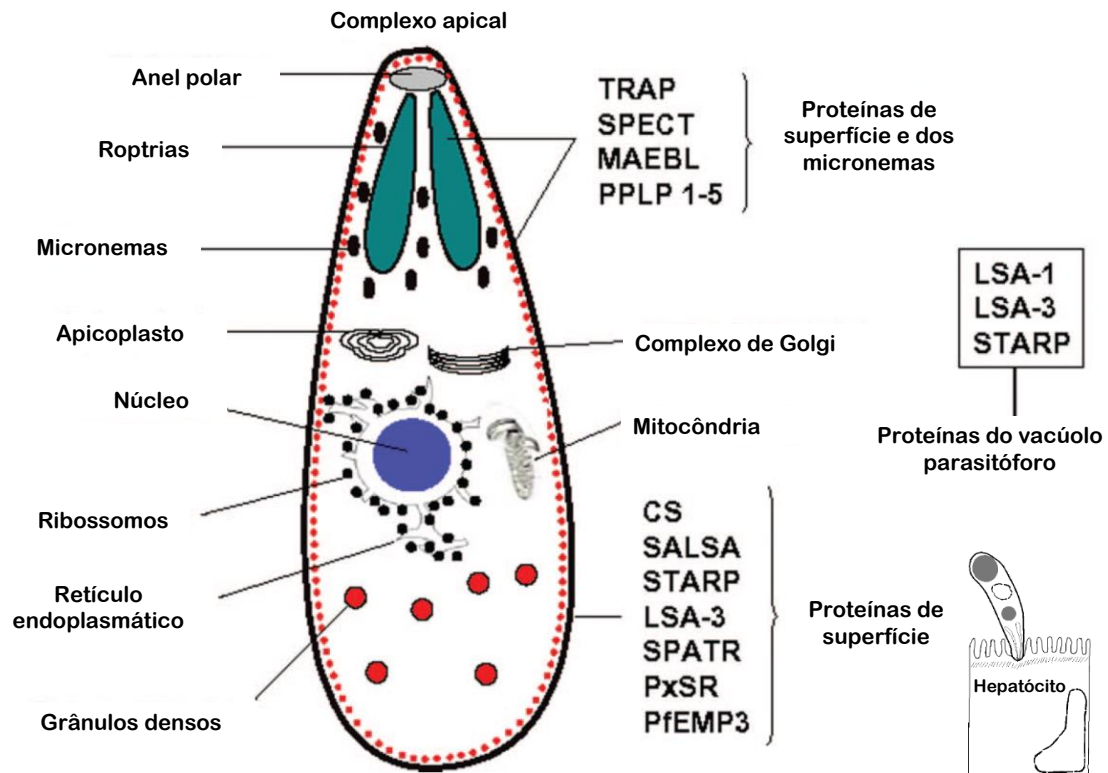
#### I.2.1.1. Ciclo evolutivo do *Plasmodium* no hospedeiro humano

O ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* que afetam o ser humano apresenta duas fases complementares: uma fase sexuada (com desenvolvimento no mosquito do género *Anopheles*) e outra assexuada (no hospedeiro humano) [1, 9]. Na fase sexuada (esporogonia) ocorre a multiplicação do parasita em algumas espécies de mosquitos do género anófeles; enquanto na fase assexuada endógena (esquizogonia) a multiplicação do parasita ocorre no humano. Esta última fase inclui o ciclo que evolui nas células do parênquima hepático (esquizogonia tecidual) e o ciclo que se desenvolve nos glóbulos vermelhos (esquizogonia eritrocítica) [1, 9].

Os doentes e os casos assintomáticos, ambos com gametócitos no sangue, constituem as fontes de transmissão do parasita. Os gametócitos quando ingeridos pelas fêmeas dos anofelinos iniciam a fase sexuada.

A infeção por malária no Homem inicia-se quando, durante a sua refeição sanguínea, o mosquito fêmea inocula no humano os esporozoítos. Aproximadamente 15 a 200 esporozoítos são inoculados sob a pele do hospedeiro, alcançando posteriormente a corrente sanguínea. Neste processo diversas moléculas da superfície do esporozoíto exercem o papel de ligantes aos recetores das células do hospedeiro [1, 9]. (figura I.1).





**Figura I.1.** Estrutura celular de esporozoítio. Fonte: Garcia e cols., *Clin Microbiol Rev* 19, 2006

Os esporozoítos são móveis, apesar de não apresentarem cílios ou flagelos. Essa mobilidade está associada a proteínas de superfície do parasita, incluindo a proteína circunsporozoítica (CS) e a proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP), essenciais para a invasão das células hospedeiras. Considera-se que os esporozoítos podem transitar em células hospedeiras sem nelas se desenvolverem; o que facilita a sua migração através de diferentes células, até chegar aos hepatócitos, onde, cerca de 30 minutos após a sua inoculação, se inicia o desenvolvimento parasitário hepático [1, 9]. Depois de invadir o hepatócito, os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos pré-eritrocitários. Estes multiplicam-se por reprodução assexuada, do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos. Esta primeira fase do ciclo é denominada exo-eritrocitário, pré-eritrocitário ou tecidual e, portanto, precede o início do ciclo sanguíneo do parasita. Por este processo de desenvolvimento intra-hepática, um só esporozoítio pode produzir entre 10.000 a mais de 30.000 merozoítos. Posteriormente, ocorre a ruptura do hepatócito infetado libertando os merozoítos móveis na corrente sanguínea, que por sua vez invadem os eritrócitos e se multiplicam, iniciando o ciclo eritrocitário. Este processo ocorre entre

seis e vinte vezes em cada 48 a 72 horas, dependendo da espécie. O desenvolvimento nas células hepáticas requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae* [1 , 9].

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito vetor pode inocular populações geneticamente distintas de esporozoítos: algumas que se desenvolvem rapidamente, enquanto outras ficam em estado de latência no hepatócito por um período variável de 3 semanas a mais de um ano, antes que se inicie a reprodução, sendo por isso denominadas hipnozoítos (do grego hypnos, sono). Os hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, resultantes da esquizogonia tardia de parasitas latentes nos hepatócitos [1 , 9].

O ciclo eritrocitário inicia-se quando os merozoítos tecidulares, libertados pela rutura dos hepatócitos infetados, invadem os eritrócitos. A interação dos merozoítos com o eritrócito envolve recetores específicos, tais como as glicoforinas (glicoproteínas presentes no eritrócito), para o *P. falciparum*, e a glicoproteína do grupo sanguíneo *Duffy* para o *P. vivax*. Em relação aos eritrócitos infetados, o *P. vivax* invade sobretudo reticulócitos, o *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades, enquanto o *P. malariae* invade, preferencialmente, hemácias maduras. Estas características têm implicações diretas sobre os episódios de parasitémia verificadas nas infecções causadas pelas diferentes espécies de plasmódio [1 , 9].

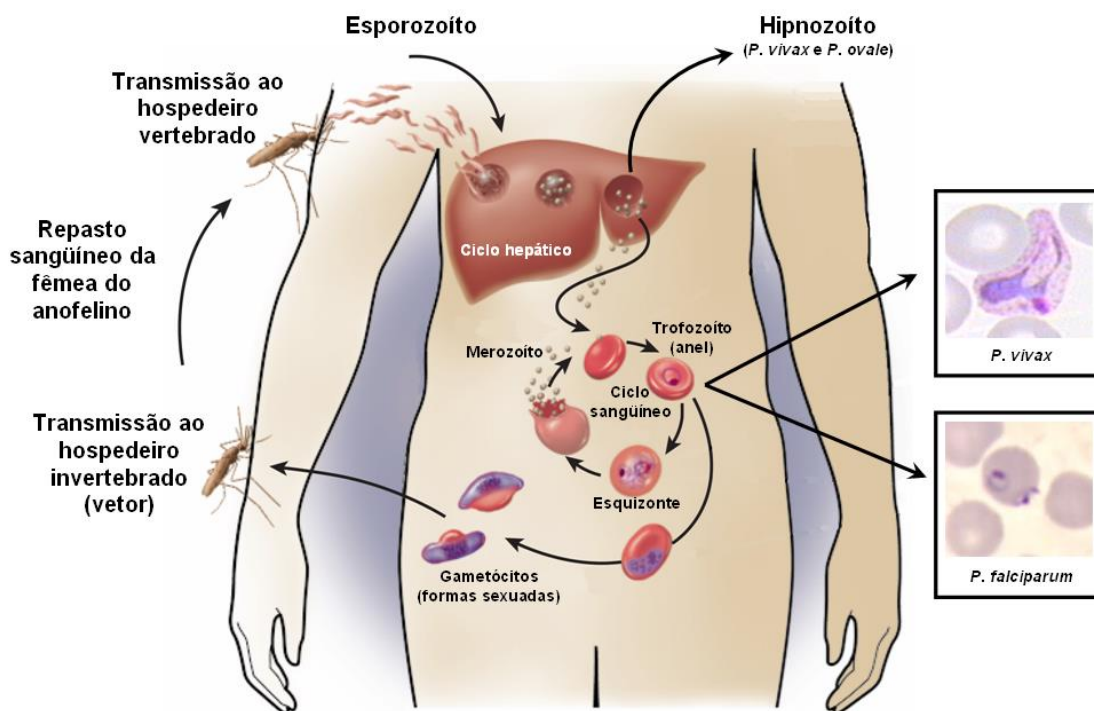
O ciclo intra-eritrocitário ocorre por esquizogonia, com formação de merozoítos. O eritrócito parasitado rompe-se, libertando 6 a 30 merozoítos e cada um dos quais invade um novo eritrócito, reiniciando-se assim um novo ciclo eritrocitário. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estadios sexuais, os gametócitos, que não se dividem e cujo desenvolvimento ocorrerá apenas no mosquito vetor, durante o ciclo sexual, dando origem aos esporozoítos (figura I.2.).

O ciclo sanguíneo repete-se sucessivamente, a cada 48 horas, nas infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, a cada 72 horas, nas infecções pelo *P. malariae*, sendo no *P. knowlesi* a cada 12 horas. Quando a parasitémia atinge uma densidade de cerca de 50 parasitas/ $\mu$ l (~100 milhões de parasita no sangue de um adulto), começa a fase sintomática da infeção [1 , 9].

A fonte de nutrição de trofozoítos e esquizontes sanguíneos é a hemoglobina, porém alguns componentes metabólicos necessários ao seu desenvolvimento são procedentes do plasma: glicose, metionina, biotina, certas purinas e pirimidinas, fosfato e ácido paraminobenzóico (PABA). A ingestão da hemoglobina ocorre através de um organelo especializado, o citóstoma. A digestão ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita,

com a formação do pigmento malárico ou hemozoína, que consiste em monómeros ou dímeros de ferriprotoporfirina IX (heme), metemoglobina e proteínas plasmodiais. A degradação da hemoglobina celular origina dois componentes: a globina e o heme. A globina é utilizada para síntese de proteínas [1, 9]. O heme forma compostos reativos de oxigénio (ROS), como aniões superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilo (OH) que são radicais livres tóxicos, que originam stress oxidativo no parasita. Por esta razão, o parasita metaboliza o heme em hemozoína ou pigmento malárico, não tóxico [1.10]. Os mecanismos de destoxificação utilizam um eficaz sistema antioxidante enzimático e não enzimático que incluem principalmente os sistemas de Superóxido dismutase, Glutathione e Tiorredoxina. Esses mecanismos de destoxificação apresentam uma importância relevante no que se refere aos mecanismos de ação dos antimaláricos [1.10].

Após o término da esquizogonia e o rompimento das hemácias parasitadas, o pigmento malárico acumulado no citoplasma do eritrócito é liberado no plasma e posteriormente fagocitado pelas células de Kupffer no fígado ou pelos macrófagos do baço e de outros órgãos [1, 9].



**Figura I.2.** - Ciclo biológico do *Plasmodium* (Adaptado de Miller e cols., *Nature* 415, 2002)

### **I.2.1.2. Ciclo do plasmódio no hospedeiro invertebrado – mosquito**

Durante a refeição sanguínea, a fêmea do mosquito anófeles ingere as formas sanguíneas do parasita, mas apenas os gametócitos serão capazes de evoluir no vetor, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogónico.

No intestino médio do mosquito, fatores como temperatura inferior a 30°C e o aumento do pH por baixa pressão de CO<sub>2</sub>, estimulam o processo de gametogénese (transformação de gametócitos em gametas extracelulares), poucos minutos após a ingestão da refeição sanguínea [1, 9]. O gametócito feminino transforma-se em macrogameta, e o gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a oito microgâmetas. O macrogameta é fecundado pelo microgâmeta, formando o ovo ou zigoto. Após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto. Este atravessa a matriz peritrófica (membrana que envolve o alimento) e atinge a parede do intestino médio do mosquito, onde se encista na camada epitelial do estômago, passando a ser chamado oocísto. Inicia-se então o processo de divisão esporogónica, após um período de 9 a 14 dias, ocorre a rutura da parede do oocísto, libertando os esporozoítos formados durante a esporogonia. Estes serão disseminados através da hemolinfa até atingir as glândulas salivares. Os mesmos atingirão o canal central da glândula e ingressarão no ducto salivar para serem injetados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante a refeição sanguínea do mosquito que se tornou infetante [1, 9].

### **I.2.2. O hospedeiro humano**

#### **I.2.2.1. Mecanismos de defesa do organismo contra o *Plasmodium***

Os mecanismos de defesa do hospedeiro humano contra a infeção por *Plasmodium* envolvem dois componentes: 1) Sistema de defesa inespecífica ou imunidade inata e 2) Sistema de defesa específica ou imunidade adquirida [1, 11].

#### **I.2.2.1.1. Imunidade inata**

Este tipo de imunidade é uma propriedade inerente ao hospedeiro, independente de qualquer contato prévio com o parasita. Ela pode ser absoluta, quando protege completamente o indivíduo da doença, como é o fato do humano não ser suscetível à infecção por plasmódio aviário ou de roedores; ou relativa nos casos em que, mesmo havendo o desenvolvimento do parasita, o processo infeccioso é autolimitado [1, 12].

Certos fatores associados ao hospedeiro podem influenciar a sua suscetibilidade à malária. Por exemplo, determinadas populações africanas apresentam deficiência do antígeno de grupo sanguíneo *Duffy* (FyFy) e são refratárias à infecção pelo *P. vivax*, o que pode explicar a raridade deste tipo de malária em certas regiões de África.

Certos polimorfismos genéticos, tais como a hemoglobinose drepanocitose (HBS), as talassémias, e a deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) estão associados à baixa suscetibilidade à infecção por *Plasmodium*. Os indivíduos portadores de drepanocitose heterozigótica HBAS, apresentam uma vantagem seletiva comparados com os homozigóticos HBAA.

Os principais componentes do mecanismo de defesa inata incluem as citocinas pro-inflamatórias, CD36, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, CR1, Locus de MHC entre outros [1, 9, 11].

#### **I.2.2.1.2. Imunidade adquirida**

Em áreas de alta transmissão, como em África e em algumas regiões da Ásia, a população desenvolve imunidade adquirida contra o plasmódio. Nessas áreas onde o *P. falciparum* é predominante, os recém-nascidos são protegidos de quadros de malária grave durante os primeiros três meses de vida, devido a transferência passiva de anticorpos IgG da mãe imune para o filho; também, nos recém nascidos, a presença de eritrócitos contendo grandes quantidades de hemoglobina fetal (HbF) cria um microambiente desfavorável ao crescimento parasitário [1, 11].

Após três meses, as crianças são muito suscetíveis à malária grave, com altas taxas de letalidade durante os dois a três primeiros anos de vida. Com o aumento da idade, as crianças em contato com o *Plasmodium* desenvolvem imunidade progressivamente e

sofrem menos episódios de malária, podendo ocorrer parasitémias significativas em crianças assintomáticas [11].

Em adultos, o quadro clínico da doença é menos pronunciado e os níveis de parasitas sanguíneos mais baixos, resultante da imunidade. Os mecanismos envolvidos neste equilíbrio imune não estão totalmente elucidados.

O processo da imunidade adquirida inclui as seguintes características:

- Em áreas de intensa transmissão, após anos de exposição os indivíduos adquirem o estado imune lentamente;
- Imunidade não esterilizante que pode manter níveis de parasitemia e patogenicidade baixos, determinando infeções assintomáticas;
- Imunidade dependente de exposição contínua ao parasita, sendo perdida cerca de um ano, após ausência de exposição;
- Equilíbrio suprimido durante a gravidez, principalmente em primigestas;
- Em áreas com baixos níveis de transmissão, crianças e adultos são igualmente acometidos e a malária grave por *P. falciparum* ocorre, principalmente, quando o diagnóstico é tardio;
- Pelas características migratórias da população exposta, indivíduos não-imunes, de diferentes idades, podem ser suscetíveis a infeção por *P. falciparum* ou *P. vivax* seguida de doença clínica de intensidade variável e, frequentemente, com vários episódios sucessivos de malária [11, 12].

### **I.2.3. O vetor da malária**

O vetor da malária pertence à família Culicídea que representa cerca de 3.500 espécies de insetos conhecidos com o nome vulgar de mosquitos, que pertencem à ordem Díptera (2 asas) e subordem *Nematócer*a (antenas filiformes). Esses insetos são caracterizados por longas e finas antenas com vários segmentos, asas com escalas e a presença nas fêmeas, de aparelho bucal em forma de tromba rígida, chamado probóscide [1].

As Culicídea estão divididas em duas subfamílias: a) Culicinae (culicíneos), que inclui dois géneros de grande importância médica: *Aedes* (p. ex. *Aedes aegypti*, o vetor da dengue e da febre amarela) e *Culex* (p. ex. *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose linfática) e b) Anophelinae (anofelíneos), que envolve o género *Anopheles* ao qual pertencem os vetores de transmissão de malária humana [1, 9].

### I.2.3.2. Mosquitos vetores de malária

O género *Anopheles* compreende cerca de 480 espécies; aproximadamente 80 são consideradas vetores da malária, das quais apenas 15 apresentam maior relevância na transmissão da malária ao humano [1, 13].

Com exceção da Antártica, os mosquitos vetores da malária são encontrados em todos os continentes, distribuídos de acordo com as condições ambientais. Em África, os principais vetores da malária são membros do complexo *Anopheles gambiae* e do grupo *Anopheles funestus* [14].

Durante o seu ciclo de vida, o mosquito passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas adultas de *Anopheles* acasalam apenas uma única vez no seu ciclo de vida. Esta única inseminação permite-lhes colocarem ovos durante todo o seu tempo de vida. O mosquito alimenta-se geralmente de seiva de plantas; porém as fêmeas precisam de realizar uma refeição sanguínea a cada 2-3 dias, sendo o sangue necessário para o desenvolvimento dos seus ovos. Os ovos são colocados no meio aquático, nomeadamente em poças, charcos, ribeiras, lagos, em grupos (posturas) de 50-200 ovos. O tempo necessário para os ovos eclodirem em larvas depende muito da temperatura: a cerca de 30°C, os ovos eclodem em 2-3 dias; em zonas temperadas (16°C), cerca de 7-14 dias.

O comportamento associado à alimentação sanguínea e ao repouso após a refeição, para o desenvolvimento dos ovos, são fatores importantes do ponto de vista epidemiológico. As espécies classificadas como antropofílicas têm preferência para se alimentar em humanos, as zoofílicas alimentam-se preferencialmente em outros animais; as espécies endofágicas picam predominantemente dentro de habitações humanas, enquanto as exofágicas têm tendência de picar fora das casas. *Anopheles gambiae* s.s. e *Anopheles funestus* s.s. são considerados antropofílicos endofágicos, enquanto *An. arabiensis* é geralmente mais zoofílico [13, 14].

### I.2.3. Distribuição da malária no mundo

A malária encontra-se distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais de diferentes continentes, áreas onde se reúnem as condições ideais para a existência do mosquito vetor e consequente transmissão da doença, nomeadamente África subsaariana, América Central e do Sul, Sudeste Asiático e Oceânia (Figura I.4). A distribuição das espécies que causam malária não é homogénea: o *P. falciparum*, a espécie mais patogénica, é

predominante em África, Nova Guiné, República Dominicana e Haiti; o *P. vivax* é mais comum na América Central. Essas duas espécies são encontradas na América do Sul, subcontinente indiano, Leste da Ásia e Oceânia. O *P. malariae* é encontrado na maioria das áreas endêmicas, especialmente na África subsaariana, mas com baixa prevalência. O *P. ovale* raramente é encontrado fora da África, onde tem apresentado prevalências inferiores a 1%. Pacientes com *P. knowlesi* têm sido identificados na ilha de Bornéu, e, em menor extensão no Sudoeste Asiático.

Globalmente, o número de casos de malária em 2016, foi estimado em 216 milhões (IC 95%: 196-263 milhões), em comparação com 237 milhões em 2010 (CI de 95%: 218-278 milhões) e 211 milhões em 2015 (CI de 95%: 192-257 milhões).

Segundo a OMS, a maioria dos casos foram registrados na região africana, com uma frequência de 90%, muito à frente da região sudeste da Ásia (7%) e da região do Mediterrâneo Oriental (2%).

Dos 91 países que reportaram casos de malária em 2016, 15 representaram 80% do número de casos registados no mundo e, quase todos se encontram na África Subsaariana, sendo os restantes registados na Índia.

De forma global, estima-se que a incidência de malária reduziu em 18 por cento, passando de 76 casos em 1 000 habitantes em risco de malária em 2010 para 63 casos em 1 000 habitantes em 2016, tendo sido observado maior declino na região sudeste asiático (48%), seguido pelas Américas (22%) e África (20%); apesar deste progresso, foi observado um aumento significativa da incidência da malária entre 2014 e 2016 nas regiões da OMS das Américas, da África, Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental.

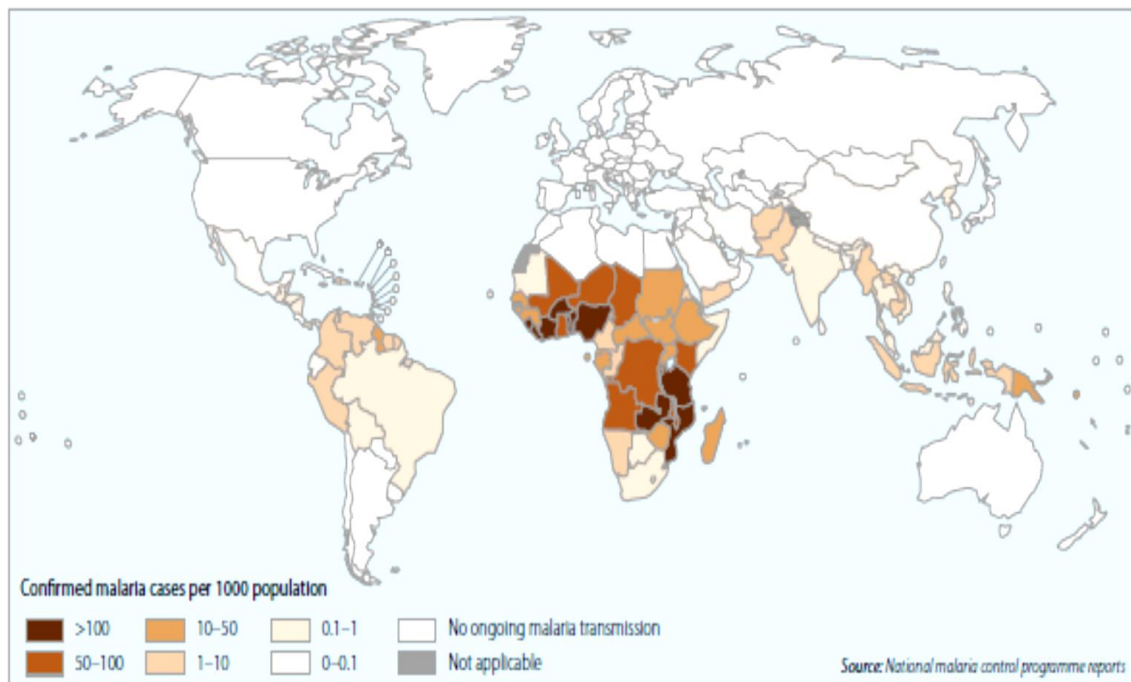
De acordo com os dados da OMS, a malária é endêmica em 104 países; no entanto, perante o fenómeno do aquecimento global e o aumento das migrações humanas, o perfil de distribuição geográfica da malária pode vir a sofrer grandes alterações.

De acordo com o perfil de transmissão, as áreas endêmicas de malária são distribuídas em três grupos principais, baseados nas taxas de prevalência de parasitemia por *P. falciparum* em crianças do grupo etário dos 2 aos 9 anos.

- 1) **Áreas de baixa transmissão**, classificadas como hipoendêmicas, apresentam taxa de prevalência de parasitemia por *P. falciparum*  $\leq 10\%$  em crianças do referido grupo etário, durante a maior parte do ano. Nestas áreas a infeção e doença por malária ocorrem com uma frequência baixa e de forma similar em qualquer grupo etário; a população desenvolve pouca imunidade e podem ocorrer surtos epidémicos.



- 2) **Áreas de transmissão moderada** ou mesoendémicas, apresentam taxa de parasitémia por *P. falciparum* de 11- 50% no grupo etário de referência, durante a maior parte do ano; nestas áreas a prevalência máxima da malária ocorre na infância e adolescência.
- 3) **Áreas de alta transmissão** de malária incluem as hiperendémicas, com a prevalência de parasitémia por *P. falciparum* de 51 – 75% e as áreas holoendémicas, que apresentam taxas de prevalência de parasitémia superiores a 75% no grupo etário de referência. Nestas áreas, praticamente toda a população exposta apresenta a probabilidade de ter sido infetada na infância, desenvolvendo assim uma imunidade parcial. Este indicador é geralmente utilizado para a planificação de programas de controlo da doença.



**Figura I.3.** Distribuição geográfica da malária no mundo,  
 Fonte: Relatório Mundial da Malária, OMS, 2014 (World Malaria Report)

### I.2.3.1. Fatores que influenciam a distribuição da malária

A transmissão da malária está fortemente relacionada com as condições do meio ambiente. A distribuição de vetores e da doença coincide com as condições bioclimáticas naturais (temperatura, humidade, vegetação, quedas pluviométricas) e certos fatores antropogénicos ou impacto da atividade humana na natureza (agricultura, pecuária,

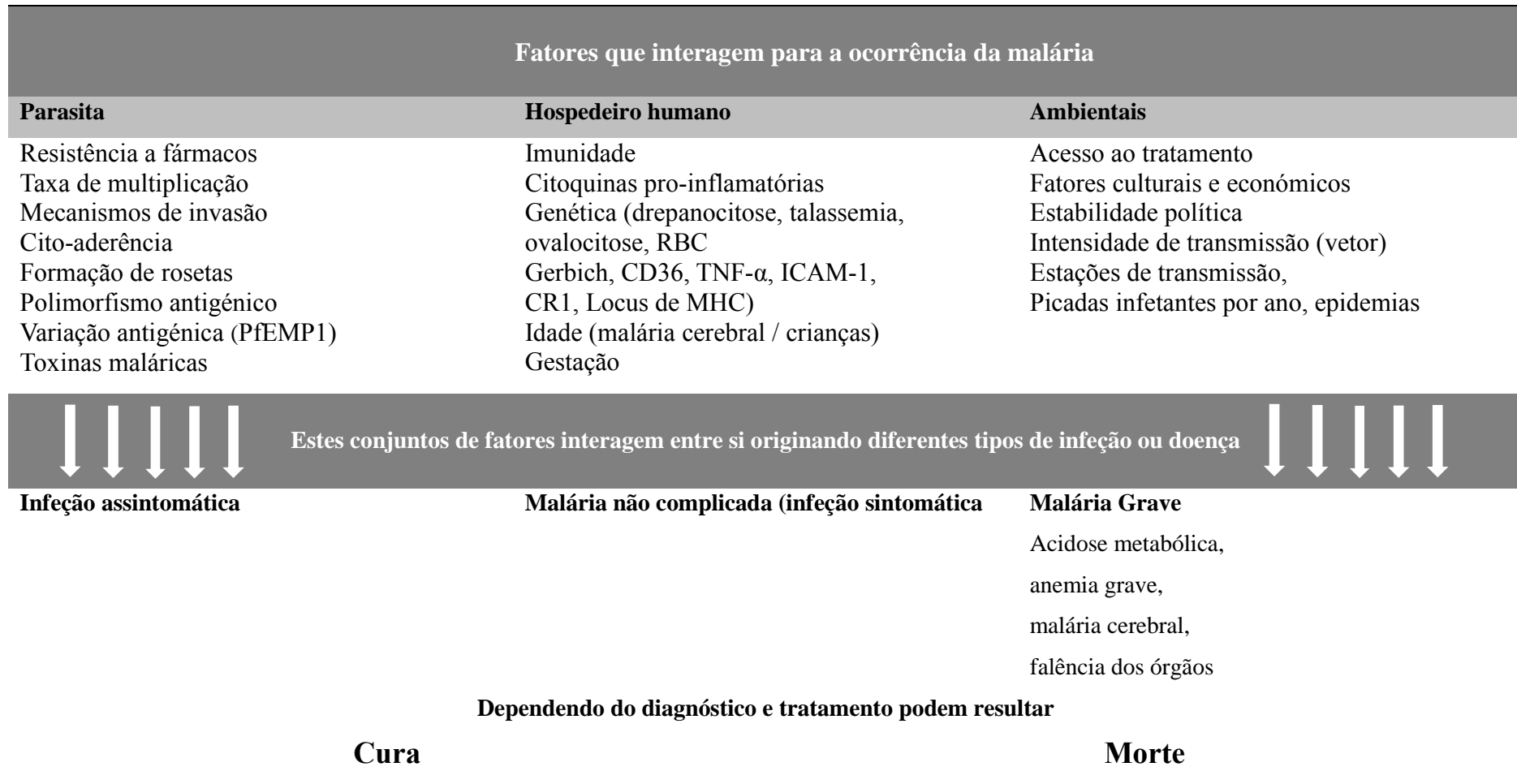
irrigação) desempenham um papel importante. Os fatores climáticos, incluindo a temperatura, o ritmo e volume de precipitação, determinam a existência de espécies vetorais, a sua abundância e duração sazonal numa determinada região [15].

O aumento da temperatura acelera o ciclo biológico do mosquito *Anopheles*, reduz a duração do ciclo esporogónico no vetor e facilita a transmissão da malária.

Os criadouros larvares gerados pela ação humana, por exemplo áreas de irrigação para agricultura, estaleiros de obras de construção, roturas de redes de distribuição de água, o desflorestamento, entre outros, contribuem para o desenvolvimento de mosquitos vetores e promovem a propagação da doença [15, 16].

Fatores como a presença de animais domésticos na proximidade de habitações podem influenciar a abundância de mosquitos e o seu contacto com o humano. Estudos conduzidos no Paquistão, Gâmbia e São Tomé e Príncipe demonstraram que a presença de animais domésticos em casas ou na sua proximidade promovem uma redução do número de picadas de mosquitos, da prevalência e da incidência de malária no humano.

Eventos específicos tais como catástrofes naturais, fenómenos de migração em massa de pessoas (refugiados), podem modular a transmissão da malária. A cobertura de intervenções da prevenção da malária é também determinante na redução da morbilidade e mortalidade devida à doença nas áreas abrangidas [15, 16].



**Figura I.4.** Fatores associados à ocorrência da malária (adaptado: causalidade em epidemiologia, modelo de Rothman & Greenland, 1988)

### **I.3. Aspetos clínicos**

#### **I.3.1. Infecção por *Plasmodium***

A infecção por plasmódio inicia-se com a inoculação e proliferação do parasita no hospedeiro humano, após picada do mosquito infetante, o seu período de incubação é de cerca de 10 a 15 dias. De forma geral, em pacientes com infecção por *Plasmodium falciparum*, o quadro sintomático ocorre no primeiro mês da infecção. Na infecção por *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium ovale*, a manifestação clínica pode ocorrer num período mais longo, podendo-se manifestar 6 meses até vários anos, após a inoculação do parasita [1, 9].

O quadro clínico ocorre na fase eritrocitária, sendo a fase exo-eritrocitária assintomática. A malária pode ter um decurso gradual ou fulminante, apresentando sintomas não específicos, o que torna por vezes difícil o diagnóstico [1, 9].

#### **I.3.2. Patogénese da Malária**

A patogénese da infecção malárica reflete a interação entre o parasita e o hospedeiro humano, envolvendo diferentes mecanismos inerentes a ambos os intervenientes [9, 17]. O processo inicia-se quando os esporozoítos de plasmódio entram nos hepatócitos do hospedeiro, após a inoculação na circulação sanguínea, conforme acima descrito (I.2.1.1.; figura I.2.). Os distúrbios circulatórios generalizados resultam de diversos fatores, incluindo a invasão e destruição dos eritrócitos, os efeitos de produtos de excreção do parasita, do material de desgaste celular do hospedeiro e de diversos complexos antígeno-anticorpos que estimulam as células do sistema imunitário e as células endoteliais para a libertação de citocinas pró-inflamatórias [9, 17]. A maior parte dos sinais e sintomas da malária, particularmente os do paroxismo malárico caracterizado por febre, calafrios, cefaleia intensa e transpiração devem-se à ação das citocinas. Estas estão também envolvidas na supressão da eritropoiese, disfunção hepática, inibição da gliconeogénese e disfunção placentária na grávida.

Os episódios periódicos de febre que caracterizam a malária são decorrentes da rutura sincronizada dos eritrócitos, com libertação dos merozoítos, de restos celulares e aumento dos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Na malária grave ocorre secreção em cascata de citocinas tais como, TNF- $\alpha$ , interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interferão gama (IFN- $\gamma$ ) que por sua vez induzem a liberação de outras citocinas, incluindo interleucina-8 (IL-8), interleucina-12 (IL-12) e interleucina-18 (IL-18), em simultâneo com as citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-10 (IL-10) [9, 17].

Na infeção por *P. falciparum*, pode ocorrer o sequestro dos eritrócitos infetados e sua escassez na circulação periférica devido à cito-aderência, caracterizada pela formação de protuberâncias ou *knobs* na superfície dos eritrócitos infetados e adesão destes nas células do endotélio vascular. Este fenómeno pode resultar no bloqueio do fluxo sanguíneo dos capilares e vénulas afetadas, obstrução da microcirculação e do fluxo de oxigénio, levando à glicólise anaeróbia e acidose láctica. Quando a obstrução ocorre em órgãos vitais como rins e cérebro, pode resultar em complicações como insuficiência renal e malária cerebral, com elevada taxa de letalidade [9, 17].

Os indivíduos não imunes, tais como viajantes provenientes de regiões não endémicas de malária e crianças com idades inferiores a cinco anos, apresentam maior risco da ocorrência de complicações e letalidade [11, 12].

### **I.3.3. Quadro clínico da malária**

#### **I.3.3.1. Malária não complicada**

A malária não complicada por *P. falciparum* é definida como malária sintomática, sem sinais e sintomas de malária grave, ou evidência de disfunção de órgãos vitais [1, 4, 9].

As principais manifestações clínicas na fase aguda são comuns às espécies de plasmódio que parasitam o homem. Os primeiros sintomas da malária são inespecíficos e semelhantes aos de uma doença viral sistémica leve. O quadro clínico da malária envolve a clássica tríade febril, cefaleias e calafrios. Sintomas gerais como mal-estar, fadiga, dor muscular, dores articulares, transpiração, anorexia, desconforto abdominal e vômitos podem preceder ou acompanhar a tríade, podendo muitos dos referidos sintomas estar ausentes. Em pacientes com imunidade adquirida, a infeção pode ocorrer de forma assintomática. Ao exame físico o paciente pode não apresentar qualquer alteração; os principais sinais físicos incluem: taquicardia, palidez, ictéria, hepatomegalia e esplenomegalia.

Geralmente, após tratamento antimalárico eficaz, o doente com malária não complicada tem cura, com recuperação completa e rápida. Se o tratamento não for adequado e atempado, o paciente pode evoluir para malária grave ou complicada e potencialmente fatal [1, 4, 9, 17].

A infeção por *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* apresenta um quadro sintomático mais leve, sendo raramente fatal; pode apresentar recidivas devido à formação de hipnozoítos; pelo que o desaparecimento de parasitas da circulação pode não significar a cura efetiva do paciente; a tabela 1.1. apresenta as características clínicas associadas aos diferentes *Plasmodium* [1, 9].

**Tabela 1.1.** Características de malária causada por diferentes espécies de *Plasmodium*

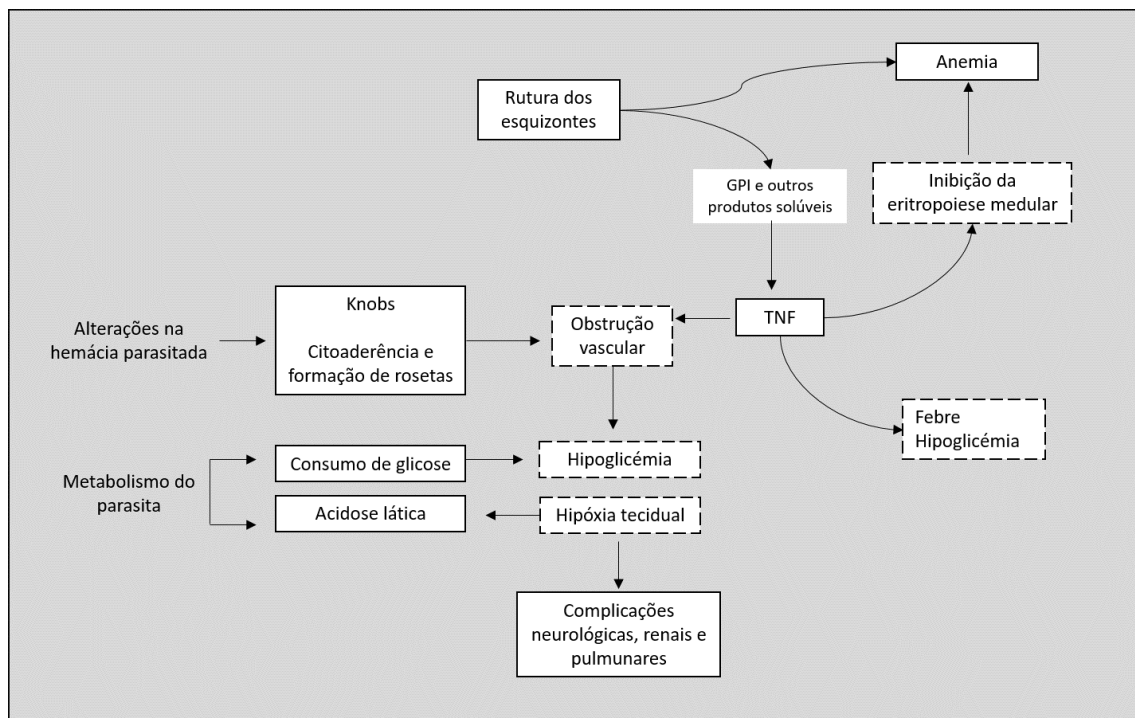
Característica		Espécie de <i>Plasmodium</i>			
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Período de incubação		8 -25 dias	8-27 dias	15 -30 dias	9- 17 dias
Presença de hipnozoítos		Não	Sim	Não	Sim
Duração do ciclo eritrocitário		48h	48h	72h	48h
Parasitémias	Média	<b>50.000 - 500.000</b>	<b>20.000</b>	<b>6.000</b>	<b>9.000</b>
(mm3)	Máxima	<b>2.500.000</b>	<b>50.000</b>	<b>20.000</b>	<b>30.000</b>
Eritrócitos infetados		Todas formas	Reticulócitos	Formas maduras	Reticulócitos

### **I.3.3.2. Malária grave ou complicada**

A malária grave geralmente ocorre na infeção por *P. falciparum*. Esta espécie apresenta características associadas a maior virulência, das quais, a capacidade de produzir grande número de merozoítos no final da esquizogonia hepática, a capacidade desses merozoítos invadirem hemácias de todas as idades, a ocorrência do fenómeno de sequestro celular, a citoaderência, a formação de roseta e hemólise. As principais formas clínicas da malária grave incluem a malária cerebral, edema pulmonar, falha renal, anemia severa e hemorragias. A acidose e a hipoglicémia constituem complicações metabólicas frequentes [4, 9, 17].

A malária cerebral é a forma mais comum de causa de morte nos pacientes com malária grave, caracterizando-se inicialmente por sonolência e confusão ou com convulsões generalizadas, com progressão para coma.

Em muitos casos, as formas clínicas de malária grave estão presentes em simultâneo no paciente ou desenvolvem-se sucessivamente num curto espaço de tempo, progredindo para a morte em poucos dias ou mesmo horas [1, 4, 9, 17]. A fisiopatologia da malária grave encontra-se ilustrada na Figura I.5.



**Figura I.5.** Fisiopatologia de malária complicada (adaptado de Miller *et al.*, Nature 415, 2002).

### I.3.4. Diagnóstico da malária

#### I.3.4.1. Microscopia

A pesquisa microscópica de *Plasmodium* no sangue em esfregaço ou em gota espessa constitui o principal método de diagnóstico [1, 4]. A gota espessa é corada pela técnica de Walker (azul de metileno e Giemsa) e o esfregaço é corado pelo Giemsa, após fixação com metanol. Além do baixo custo, ambas permitem identificar, com facilidade e precisão, as espécies de *Plasmodium* presentes. Esses métodos também possibilitam

quantificar a densidade parasitária, mediante a determinação da parasitémia por volume ( $\mu\text{l}$  ou  $\text{mm}^3$ ) de sangue. Na prática, o método da gota espessa é o mais utilizado, uma vez que a concentração do sangue por campo microscópico facilita a observação de parasitas. E por ser um método barato e de fácil execução nas áreas endémicas e que não requer equipamentos e reagentes caros e sofisticados, no entanto requer técnicos experientes para a identificação dos parasitas [1,4, 8].

#### **I.3.4.2. Testes rápidos de diagnóstico (TRD's)**

Os testes rápidos de diagnóstico de malária (TRD's), baseiam-se em imunocromatografia para detetar antígenos derivados de parasitas da malária no sangue lisado. Os testes atualmente disponíveis dependem da deteção de substâncias como a proteína rica em histidina II (HRP-II), lactato desidrogenase do parasita (pLDH). A HRP-II, uma proteína solúvel em água, produzida apenas por trofozoítos e gametócitos jovens de *P. falciparum*; lactato desidrogenase do parasita (pLDH), produzido pelas fases assexuais e sexuais (gametócitos) do parasita das espécies *falciparum* e não-*falciparum*. Os estudos referentes aos TRD's têm geralmente relatado sensibilidades superiores a 90% na deteção de *P. falciparum*, com uma densidade igual ou superior a 100 parasitas/ $\mu\text{l}$  de sangue, abaixo deste nível, a sensibilidade diminui acentuadamente. Considerando que os TRD's detetam antígenos circulantes, detetam infeções por *P. falciparum* mesmo quando os parasitas se encontram sequestrados no compartimento vascular profundo e, portanto, não detetáveis por exame microscópico de esfregaço de sangue periférico. As vantagens dos TRD's incluem a facilidade de utilização e interpretação, não exigindo a existência de eletricidade e/ou equipamentos especiais [4, 18].

#### **I.3.4.3. Outros métodos de diagnóstico**

##### **I.3.4.3.1. Técnicas de fluorescência**

A técnica de *Quantitative Buffy Coat* (QBC) baseado na fluorescência de um corante especial que adere aos ácidos nucleicos (DNA e RNA) do parasita. Esta técnica consiste em misturar a amostra de sangue do paciente com o reagente “laranja de acridina”; posteriormente centrifugar a mistura em um tubo de hematócrito. A leitura do resultado é efetuada diretamente em microscópio de fluorescência. Em ambiente laboratorial, a



técnica do QBC tem demonstrado grande sensibilidade e especificidade (aproximadamente 97% e 99%, respetivamente); não necessitando de profissionais altamente qualificados para a sua interpretação. No entanto, existem limitações à sua implementação em determinadas áreas endémicas devido à necessidade de energia elétrica e equipamento específico [4, 18].

#### **I.3.4.3.2. Testes sorológicos**

As técnicas de sorologia servem para a deteção de anticorpos contra o *Plasmodium* em amostras de soro. Marcadores específicos foram identificados para cada uma das quatro espécies mais comuns de malária humana. Um teste positivo geralmente indica que ocorreu uma infeção; no entanto, a sorologia não é um método útil no diagnóstico de infeções agudas porque os níveis detetáveis de anticorpos contra a malária mantêm-se durante várias semanas após início da infeção e persistem, por muito tempo, após a eliminação da parasitémia [4, 9].

#### **I.3.4.3.3. Estudos moleculares**

Os estudos moleculares são habitualmente utilizados para estudos epidemiológicos. A deteção do material genético do parasita através de técnicas de biologia molecular, baseadas em PCR (*Polimerase Chain Reaction*), nomeadamente Real Time PCR, PCR-RFLP (*PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequenciação de DNA e microssatélite, são ferramentas usadas na identificação e apoio ao diagnóstico da malária, bem como na vigilância de resistência aos antimaláricos. O PCR permite a deteção de infeções mistas ou diferenciação de espécies envolvidas. Este método é utilizado para a realização de estudos epidemiológicos moleculares da malária ou em massas populacionais em situações de epidemias. As principais desvantagens destes métodos são o elevado custo, a necessidade de treinamento e equipamentos dispendiosos e específicos [4, 9].

### **I.3.5. Tratamento da malária**

Os objetivos do tratamento da malária são: a) reduzir a mortalidade; b) prevenir as complicações; c) eliminar a parasitémia para minimizar a transmissão, reduzindo assim a morbidade na população e d) limitar a emergência e a expansão de resistência aos antimaláricos.

#### **I.3.5.1. Tratamento da malária não complicada**

A OMS recomenda o uso de combinações terapêuticas à base de artemisinina e seus derivados, para o tratamento da malária não complicada. Em Angola, é utilizada a combinação Artemeter (20 mg) - lumefantrina (120mg) (Coartem<sup>®</sup>) como fármaco de 1<sup>a</sup> linha, de acordo com a administração apresentada em Anexo II.5. O tratamento para adulto consiste em 4 comprimidos, em dose única, no momento do diagnóstico, e 4 comprimidos 8h após a primeira toma e, 4 comprimidos duas vezes ao dia (manhã e noite) em cada um dos 2 dias subsequentes (total de 24 comprimidos). Em crianças com peso inferior a 35 Kg, as doses são ajustadas de acordo com o seu peso, conforme a tabela em anexo (II.5) [4, 9].

As outras combinações disponíveis mas utilizadas em menor quantidade incluem, artesunato + amodiaquina e dihidroartemisinina + piperaquina, sulfadoxina – pirimetamina (SP) + AS [1, 4].

#### **I.3.5.2.2. Tratamento de malária grave e complicada**

O Dihidrocloridrato de quinina por via endovenosa constitui o principal fármaco para o tratamento da malária grave e complicada, principalmente em África (incluindo Angola), onde a sensibilidade do *Plasmodium* a este fármaco ainda é elevada. O uso dos derivados de artemisinina por via parentérica (IM, rectal) são igualmente indicados como alternativa no tratamento da malária grave e complicada [4, 9, 17]

#### **I.3.5.3. Tratamento presuntivo intermitente (TIP)**

O TIP é baseado na administração de 3 comprimidos de sulfadoxina + pirimetamina em toma única mensal, a partir da 20<sup>a</sup> semana da gravidez, este é também o esquema adotado

em Angola. Este tratamento profilático é administrado na consulta pré-natal sob observação direta (DOT) do técnico de saúde. O seu objetivo é o de reduzir as complicações da malária na grávida com destaque para a anemia, parto prematuro, morte fetal intra-uterina e baixo peso à nascença [4].

#### **I.3.5.4. Tratamento profilático da malária**

Existe uma vacina em fase III do processo experimental, ainda não disponível para o uso corrente; determinados fármacos com ação esquizonticida sanguínea têm sido usados como forma de prevenir os quadros clínicos da malária, principalmente em viajantes para as áreas endémicas da Ásia e África.

O fármaco mefloquina (250 mg semanalmente) tem sido utilizado com frequência como profilático; a medicação é iniciada uma semana antes da deslocação para a área endémica e interrompida quatro semanas após o regresso à zona de origem. Na política de controlo da malária em Angola, não está indicado tratamento profilático da doença [4].

#### **I.3.5.5. Tratamento de infeção assintomática de malária**

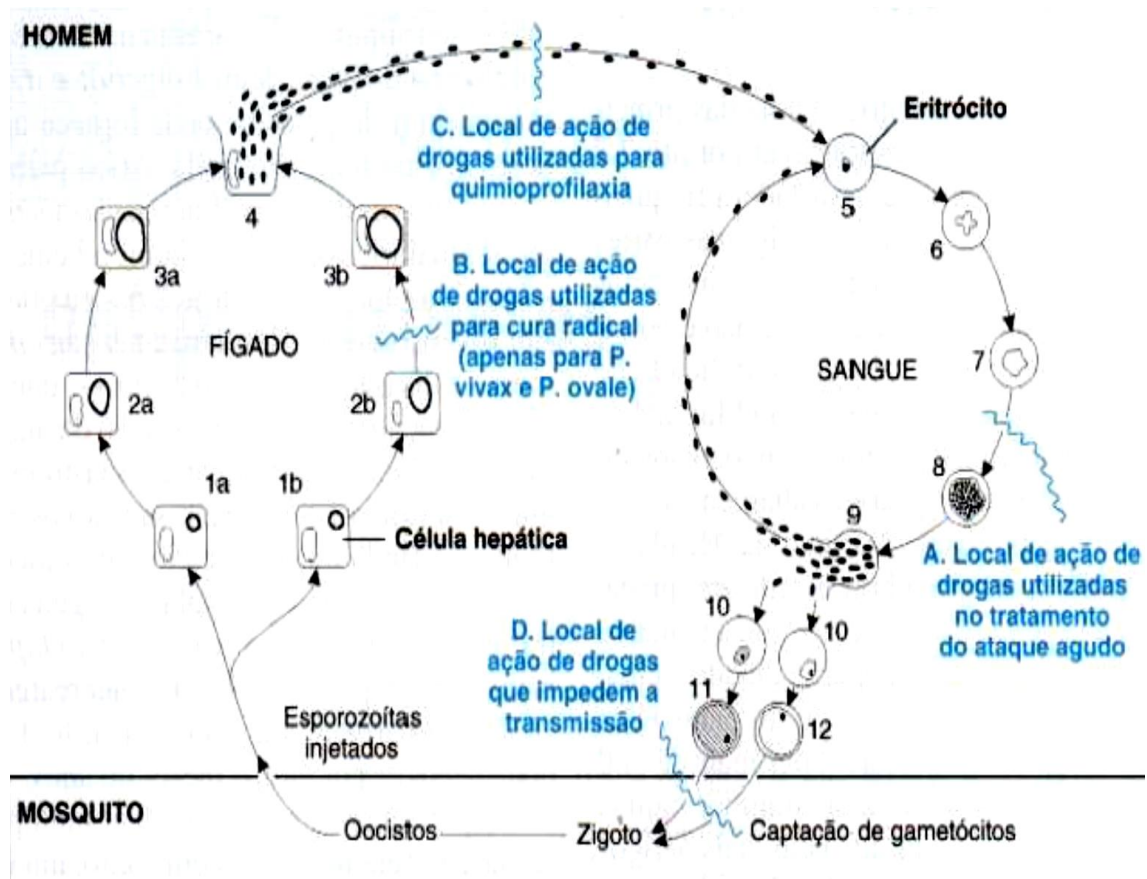
A OMS recomenda o esquema de tratamento com ACT da primeira linha, em casos de deteção desta forma da infeção, de forma a impedir a transmissão [4].

### **I.3.6. Fármacos antimaláricos**

#### **I.3.6.1. Classificação de antimaláricos**

Os fármacos antimaláricos são classificados 1) de acordo com o seu efeito farmacológico, em profiláticos, utilizados para prevenir a doença ou curativos, para tratar ataques agudos; 2) de acordo com a sua ação seletiva sobre os diferentes estadios do parasita no seu ciclo evolutivo no humano, sendo: a) Os esquizonticidas sanguíneos ou agentes supressores, que atuam sobre as formas assexuadas sanguíneas do parasita, interrompendo a esquizogonia eritrocitária responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infeção, eliminando os sintomas; estão incluídos nesta classe, a cloroquina (CQ), quinina (QN), amodiaquina (AQ), artemisinina e os antifolatos; b) esquizonticidas tecidulares ou

agentes profiláticos causais, que provocam destruição de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias; estes fármacos atuam sobre as formas assexuadas do parasita nos tecidos (fígado), entre eles, os esquizonticidas tecidulares primários, que atuam sobre as formas pré-eritrocíticas evitando a invasão dos eritrócitos e os esquizonticidas secundários, que atuam sobre as formas exo-eritrocíticas secundárias ou latentes evitando as recaídas; c) gametocitocidas, provocam a interrupção da transmissão do parasita, impedindo o desenvolvimento de formas sexuadas dos mesmos (gametócitos). Atuam sobre as formas sexuadas do parasita evitando a transmissão ao mosquito; incluem a primaquina e a artemisinina [1, 4, 20], ver Figura 1.6.



**Figura I.6.** - Local de ação dos fármacos antimaláricos (Range *et al*, 2001).

Os antimaláricos são também agrupados de acordo com as classes químicas, estando as principais classes e mecanismos de ação das mesmas ilustradas na tabela I.2,

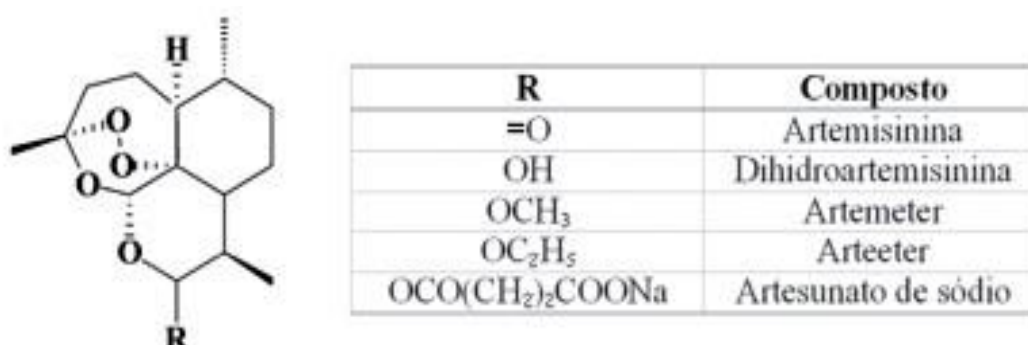
**Tabela I.2.** – Classificação dos antimaláricos em relação à classe química, fase do ciclo em que atuam, tempo de semivida e mecanismo de ação

Classe química	Antimalárico	Fase do ciclo em que atuam	Tempo de semivida	Mecanismo de ação
Lactona sesquiterpénica	Artemisinina	Esquizonticída sanguíneo, gametocída ( <i>P. falciparum</i> )	1h	Inibição de adenosina trifosfatase de cálcio (pfATPase 6)
	Artesunato		45 min - 1h	
	Artemeter		1h	
	Dihidroartemisinina		45min -1h	
Quinolina-metanóis (Amino-alcool)	Quinina	Esquizonticída sanguíneo, gametocída ( <i>P. vivax, malariae e ovale</i> )	11-16 h	Interfere com a destoxificação do grupo heme
	Mefloquina	Esquizonticída sanguíneo	2 a 3 semanas	
	Quinidina		3-6 Dias	
	Lumefantrina			
Derivados do fenantreno-metanol	Halofantrina		16h	
4-Aminoquinoleína	Cloroquina	Esquizonticída sanguíneo	1-2 Meses	
	Amodiaquina		2 Semanas (?)	
	Piperaquina		5 Semanas	
8-Aminoquinoleína	Primaquina	Esquizonticída tecidular, Gametocída ( <i>P. falciparum</i> ), Hipnozoitícida	3-6 h	Desconhecido
Diaminopirimidina	Pirimetamina	Esquizonticída sanguíneo, esquizonticída tecidular	4 Dias	Inibição da dihidrofolato redutase
Biguanida	Proguanil	Esquizonticída sanguíneo	20h	
Sulfonamida	Sulfadoxina	Esquizonticída sanguíneo	4 a 9 Dias	Inibidor competitivo da dihidropteroato sintetase
Naftoquinona	Atovaquona	Esquizonticída sanguíneo	3 Dias	Interfere com o citocromo transportador de eletrões

### I.3.6.2. Fármacos utilizados em combinações terapêuticas a base de artemisinina

#### I.3.6.2.1. Artemisinina

A artemisinina, é o princípio ativo de uma planta medicinal (*Artemisia annua*), utilizada como antipirético na China, há cerca de 2000 anos [20]. A artemisinina pertence à classe de lactona sesquiterpénica, tem como fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O_5$ ; contém na sua estrutura química uma função endoperoxidase, a qual é atribuída a sua atividade antimalárica. Devido ao fato da artemisinina ser insolúvel, foram sintetizados os seus derivados para melhorar a solubilidade e a ação antimalárica (figura I.8), dos quais, o artemeter, solúvel em lípidos, utilizado para administração oral, intramuscular e retal; os outros derivados incluem o artesunato (AS) ou ácido artesúnico, solúvel em água, vantajosos para administração intravenosa, intramuscular e retal; a dihidroartemisinina (DHA) e o arteéter. A artemisinina e derivados, quando usados sob regime de monoterapia e de curta duração, tem tendência para ocasionar infeções recrudescentes, este fato está provavelmente associado com o seu curto tempo de semivida. Para melhorar as taxas de cura, é recomendado um tratamento com duração de sete dias, ou principalmente em combinação com outros antimaláricos eficazes e de eliminação lenta. Esta prática é utilizada, e recomendada pela OMS, para reduzir as recrudescências e prevenir ou retardar o desenvolvimento da resistência do parasita ao fármaco. As ACTs disponíveis incluem: Artemeter-lumefantrina (AL), artesunato-amodiaquina (AS+AQ), artesunato-mefloquina (AS+MQ) e Dihidroartemisinina - piperaquina (DHA+PPQ). Neste trabalho, foi estudada a combinação Artemeter + Lumefantrina (AL) [4][20].



**Figura I.7.** Estrutura química da artemisinina e seus derivados (Farmacopeia, 2010).

#### **I.3.6.2.2. Artemeter**

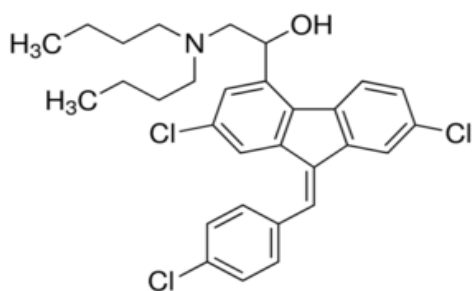
O artemeter é um esquizonticida sanguíneo de ação rápida e gametocida, contra todos os parasitas da malária humana; não apresenta atividade antimalárica contra as formas hepáticas. O mecanismo de ação deste fármaco não está completamente esclarecido, no entanto tem sido sugerido que atue na quebra da ligação peróxido, por reação do fármaco com o Fe (II) do grupo heme, no vacúolo do parasita, gerando radicais que provocam inibição de várias enzimas e da destoxificação do heme e a inibição de bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , dependente do ATP (*pfATP6*), localizada no retículo endoplasmático do parasita [1, 20]. O artemeter tem um papel importante no tratamento da malária por *P. falciparum* multiresistente, sendo eficaz no tratamento de malária causada por estirpes resistentes à quinina e na malária grave (cerebral) [4, 20]. Contudo, a sua eficácia é reduzida devido ao curto tempo de semivida que apresenta no plasma ( $t_{1/2}$  de eliminação curto, de aproximadamente 4 horas), o que o torna pouco útil na quimioprofilaxia.

De forma geral, a artemisinina e derivados são melhor tolerados, e com toxicidade baixa quando comparados com a maioria dos antimaláricos de outras classes.

A biotransformação do artemeter ocorre no fígado, principalmente através de reações de fase I e desalquilação oxidativa por enzimas do citocromo P450 incluindo CYP3A4, CYP3A5 e outros sistemas enzimáticos. O artemeter é rapidamente absorvido após administração oral e possui um período de semivida de 1 a 3 horas após ingestão. Este fármaco é considerado um potente indutor do próprio metabolismo através da indução de CYP3A4 e outras famílias do citocromo P450, como o CYP2C19 e CYP2D6. Essa indução enzimática pode resultar em interação com outros fármacos, fato que deve ser tido em consideração quando o artemeter é administrado em conjunto com outros fármacos, substratos do citocromo P450, tais como certos antituberculosos e anti-VIH [4] [18][20].

#### **I.3.6.2.3. Lumefantrina (LUM)**

A lumefantrina pertence à classe dos aril amino álcoois (Quinolinometanóis), como a quinina e mefloquina; tem fórmula molecular:  $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{Cl}_3\text{NO}$ ; peso molecular de 528,24 KDa e densidade de 1,252; apresenta-se sob a forma de pó amarelo inodoro, muito lipofílico, sendo solubilizada em ácidos gordos insaturados.



**Figura I.9.** Estrutura química da Lumefantrina (Farmacopeia, 2010).

A LF é um esquizotocida sanguíneo de ação prolongada e lenta que atua nos estádios intra-eritrocitários assexuados. Como quinolinometanois, o seu mecanismo de ação é atribuído à inibição da produção de hemozoína, tanto por ligação direta ao grupo heme, quanto por inibição da heme polimerase. Também, tem sido referida a interação de LUM com os lipídios da membrana celular, tornando a camada lipídica dos eritrócitos mais compacta e condensada e alterando a sua permeabilidade, o que dificulta a invasão pelo parasita [18, 20].

O metabolismo da LUM é realizado pela isoforma CYP3A4 do citocromo P450, através de N-desbutilação, originando desbutil-lumefantrina (DLF), com ação antimalárica, *in vitro*, de cinco a oito vezes superior ao composto original. Num estudo realizado pela Novartis®, observou-se que a produção deste metabolito nos humanos é de apenas 1%, sugerindo uma baixa taxa de biotransformação e predomínio da forma original no sangue. No processo do metabolismo de artemeter e lumefantrina, estão também envolvidas as enzimas CYP2B6, CYP2C9 e CYP2C19, bem como a P-glicoproteína 1 (MDR1) [18, 20]

Considerando a sua localização, a P-gp está envolvida na absorção intestinal e excreção biliar e renal tanto do artemeter como da lumefantrina. As proteínas mencionadas são codificadas por genes que exibem um número significativo de polimorfismos (SNP's), resultado da evolução e de condições ambientais; portanto o fator genético constitui um determinante relevante da variação inter-individual na farmacocinética e farmacodinâmica desses antimaláricos [21].

Do ponto de vista da farmacocinética, na combinação AL, o artemeter é absorvido e transformado rapidamente no metabólito ativo, o dihidroartemisinina. A semivida de eliminação terminal de ambos, artemeter e dihidroartemisinina é inferior a 1 hora. A absorção da lumefantrina é mais lenta e mais estável, com picos de concentração



ocorrendo em aproximadamente 6 h após a dose, tendo a sua semivida da eliminação terminal de 3-5 dias, em pacientes com malária. Estudos farmacocinética-farmacodinâmicos da AL têm mostrado que a AUC (Área da curva de concentração plasmática do fármaco em tempo determinando) da lumefantrina é o principal determinante da cura subsequente [18, 20]. A concentração plasmática de lumefantrina no dia 7 tem sido utilizada como indicador para avaliação da resposta terapêutica a AL. Valores do AUC plasmática superiores a 500 ng/ml no D7, têm sido associados com elevadas taxas de cura, superiores a 90%; enquanto valores abaixo de 280 ng/ml, no dia 7, estão associados ao insucesso terapêutico.

Na monitorização clínica de ACT's, a taxa de deteção da parasitémia no dia 3 e a de infecção recrudescente no dia 28 de seguimento, constituem parâmetros para avaliação da eficiência do artemisinina e do fármaco parceiro como a lumefantrina, respetivamente [22, 23].

#### **I.4. Metabolismo de fármacos e xenobióticos**

O ser humano está constantemente em contacto com milhares de substâncias químicas estranhas ao organismo (xenobióticos) através de exposição accidental a contaminantes ambientais, exposição intencional pelos alimentos, medicamentos ou outros produtos químicos. No organismo, os xenobióticos, requerem ser submetidos ao processo de biotransformação ou metabolismo, para serem convertidos em metabolitos facilmente utilizados e excretados. Este processo metabólico dos xenobióticos envolve reações químicas que decorrem em diferentes fases, sendo as principais, fase I e fase II de biotransformação [24].

##### **I.4.1. Reações de fase I do metabolismo**

As reações de fase I ou funcionais envolvem oxidação, redução ou hidrólise, que consistem na incorporação de um grupo reativo no substrato para o tornar quimicamente ativo. Em determinadas reações, os metabolitos oxidados resultantes são quimicamente mais reativos que o composto inicial, podendo ser mais tóxicos ou mais carcinogénicos. As enzimas que participam nas reações de fase I estão localizadas, principalmente, no retículo endoplasmático da célula hepática, e são designadas de enzimas microssomais.

A maioria dos processos oxidativos de fase I envolve enzimas da superfamília de citocromo P450 (CYP) [25, 26].

As reações de fase II ou de conjugação atuam sobre o grupo reativo criado na fase I; introduzem componentes hidrofílicos, tais como o grupo acetil, sulfato de sódio, glicina ou ácido glicurónico, no substrato criado na fase I, gerando produtos ou compostos hidrofílico menos reativos ou inativos, facilmente excretados. Estas reações são catalisadas por um grupo de enzimas chamado transferases, incluindo UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), as sulfotransferases (SULTs) e as glutathione-S-transferases (GST). A maioria das transferases localiza-se no citosol, exceto as UGT's que catalisam a glucuronidação, que é uma enzima microsomal.

Os níveis da concentração celular de xenobióticos são também regulados pelas proteínas transportadoras localizadas na membrana celular, incluindo as ABC (*ATP Binding Cassette*), principalmente a glicoproteína-P1 (Pgp) ou MDR1 analisada neste trabalho, e pelos aniões orgânicos transportadores de polipeptídeo 2 (OATP2). Este processo transportador, considerado como Fase III do metabolismo, assegura o fluxo de iões de micro ou macromoléculas e de proteínas, através das membranas biológicas.

A ativação de enzimas das reações de fases I e II, bem como de proteínas da fase III é estimulada pelo aumento de concentrações celulares de xenobióticos. Neste processo participam os recetores nucleares, nomeadamente o recetor pregnane-X (PXR), o recetor constitutivo de andrógenos (CAR) e o aril hidrocarboneto (AhR). Estes recetores detetam os níveis de concentração de xenobióticos e agem como reguladores da atividade das enzimas e de proteínas portadoras, através do sistema modulador (indução/inibição) [26, 27]. A tabela I.3 e a figura I.11 ilustram as fases do metabolismo e elementos envolvidos.

**Tabela I.3.** Fases e tipos de reações metabólicas e enzimas envolvidas

Reação	Tipo de reação	Enzimas / proteínas envolvidas
<b>Fase I</b>		
Oxidação	Hidroxilação, N-e O-Desalquilação, Desaminação Desalogenação oxidativa N-e S-Oxidação	Sistema de monooxigenases de citocromo P450
Redução	Desidratação desidrogenase Desidratação de aminas Redução de compostos de carbonil	Sistema de monooxigenases contendo flavina (FMO) Álcool desidrogenase e aldeído Monoamino-oxidase Carbonil redutases
Hidrólise	Hidrólise de epóxidos Hidrólise de ésteres Hidrólise de peptídeos	Epóxido hidrólase Carboxilesterases Peptidases
Outros	Oxidação de aniões de superóxidos Oxidação de peróxidos	Superóxidos desmutases Peroxidasas
<b>Fase II</b>		
Conjugação	Glucuronosilação Sulfonação Acetilação Metilação Glutationa S-conjugação	UDP-glicuronil transferase Sulfotransferases N-acetiltransferases O-, N e S-metiltransferases Glutationa S-transferases
<b>Fase III</b>		
Transporte	Transportadores de efluxo dependentes do ATP Sistemas de captação é o transportador de aniões orgânicos	MDR1 (P-glicoprotéina1)  OATP, SLC21A (solute carrier organic anion transporter)
<b>Moduladores</b>		
Modulação Ind./Inib.	Fatores de transcrição	Recetores nucleares (PXR, CAR)

## I.5. Falência terapêutica aos antimaláricos

A falência terapêutica refere-se à incapacidade da eliminação da parasitémia ou dos sintomas clínicos após administração de fármacos antimaláricos [8]. Os fatores que podem contribuir para a falha terapêutica incluem: a administração de antimaláricos de baixa qualidade ou em dosagens incorretas e interações medicamentosas; a baixa aderência de pacientes ao tratamento; bem como os fatores genéticos, incluindo os polimorfismos em *pfmdr1*, *pfatp6* e *pfK13* associados à tolerância e resistência do *Plasmodium falciparum* a fármacos e SNP's em genes codificadores de proteínas

enzimáticas e transportadores (por exemplo CYP450 e a P-gp/MDR1), envolvidas no processo de metabolismo de fármacos no humano [21].

## **I.6. Genética associada à terapia antimalárica**

A designação de polimorfismo genético refere-se a uma variação na sequência do DNA que ocorre na população de forma estável, sendo encontrada com frequências iguais ou superiores a 1%, e que não afeta a existência dos indivíduos. Se a frequência de uma variação for inferior a 1%, a mesma será considerada simplesmente uma mutação. No entanto, o termo SNP - polimorfismo genético pontual (*single nucleotide polymorphism*) refere-se a uma variação na sequência de DNA que afeta apenas uma base (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)) na sequência do genoma [28, 29]<sup>i</sup>. No entanto, alguns autores consideram a troca de poucos nucleótidos, assim como pequenas inserções ou deleções (indel) como SNP's.

Os SNP's podem acarretar mudanças morfológicas ou funcionais (fenótipos), que podem influenciar a resposta dos organismos à doença, a agentes biológicos e químicos, incluindo fármacos.

### **I.6.1. Polimorfismos em genes do parasita da malária**

#### **I.6.1.1. Resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos**

A resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos foi definida como a capacidade de uma estirpe de parasita sobreviver e multiplicar-se apesar da administração e absorção de um antimalárico, em doses iguais ou superiores às normalmente recomendadas, mas dentro da tolerância do organismo humano, desde que a forma ativa do fármaco aceda ao parasita ou ao eritrócito infetado, durante o tempo necessário para a sua ação normal [30].

A multiresistência aos antimaláricos refere-se ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, fato observado principalmente em *P. falciparum*. Esta situação pode afetar os fármacos de forma simultânea ou como resistência cruzada. Geralmente envolve fármacos que pertencem à mesma família química ou que têm modos de ação semelhantes, porém, pode também afetar compostos antimaláricos de classes químicas e com modos de ação diferentes.

Habitualmente, a resistência resulta da demora ou falha da eliminação das formas parasitárias assexuadas no sangue, permitindo a produção de gametócitos com mutações que são responsáveis pela transmissão do fenótipo resistente e sua manutenção na população humana infetada [31].

#### **I.6.1.1.1. Emergência e propagação da resistência**

De forma geral, o desenvolvimento de resistência ocorre em duas fases: inicialmente, um evento genético produz uma mutação no parasita, capaz de conferir resistência (mutação *de novo*), o que permite ao parasita sobreviver na presença de um determinado fármaco; numa segunda fase, as estirpes mutantes são selecionadas, provavelmente pela exposição a concentrações sub-terapêuticas de fármaco e multiplicam-se, originando o aparecimento de uma população parasitária não sensível ao tratamento; a estirpe tolerante é posteriormente transmitida a outros indivíduos, permitindo assim a sua fixação na população [23, 31]. Geralmente, o surgimento de mutações que levam à resistência é um evento espontâneo e raro, ocorrendo de forma aleatória independentemente do fármaco. Após o surgimento de parasitas resistentes e sua seleção, torna-se difícil prevenir a propagação da resistência na população [23].

O surgimento da resistência pode ser facilitado pelo uso de fármacos com tempos de eliminação longos; nessa situação, após administração do fármaco, as concentrações iniciais são elevadas o suficiente para matar as estirpes sensíveis do parasita e as parcialmente resistentes; posteriormente, as concentrações do fármaco irão diminuir progressivamente podendo atingir níveis muito baixos que permitam a seleção do parasita tolerante e resistente; as concentrações podem atingir níveis tão baixas que se tornam não letais até para estirpes sensíveis [23, 31].

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o surgimento da resistência do *Plasmodium* ocorre principalmente em áreas de baixa transmissão, onde as infecções são geralmente sintomáticas e um maior número de pessoas recebe tratamento, o que ocasiona maior exposição aos medicamentos e oportunidade para seleção do parasita. O mesmo não acontece em áreas de alta transmissão, onde a maioria das infecções é assintomática e os indivíduos adquirem imunidade parcial que permite eliminar o parasita e controlar a infecção [23, 31]. Considerando que o sistema imunitário destrói as estirpes do parasita, independentemente do seu estatuto genético, a probabilidade de estirpes resistentes sobreviverem em todos os estádios do ciclo evolutivo é reduzida; este fato diminui a

possibilidade de transmissão e propagação da resistência e torna as áreas de alta endemicidade menos suscetíveis ao surgimento dos fenótipos resistentes [21, 23].

Em relação à propagação, as mutações podem ter origem em populações parasitárias da mesma área geográfica ou de diferentes áreas. A migração populacional contribui para a disseminação da resistência, podendo veicular estirpes de parasitas mutantes e recombinantes de uma determinada área geográfica para diferentes regiões [32]. Por exemplo, a resistência do *P. falciparum* à cloroquina foi detetada de forma simultânea na América do Sul (Colômbia) e na Tailândia em 1960 e 1961, respetivamente, tendo ocorrido uma propagação progressiva que afetou praticamente todas as regiões endémicas de malária por *P. falciparum* na América do Sul, na Ásia e, posteriormente em África. Deste modo, a resistência à artemisinina reportada na Tailândia e no Camboja desde 2008, constitui um risco potencial na perda da eficácia de ACT's [33].

#### **I.6.1.1.2. Base genética da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos**

Em estudos genéticos de resistência a antimaláricos em *Plasmodium falciparum*, têm sido utilizadas como referência duas estirpes clonais do parasita: Dd2 (CQR), que representa a estirpe resistente à cloroquina e 3D7 (CQS), representando a estirpe sensível. Por exemplo, resultado do mapeamento do DNA do *P. falciparum* efetuado a partir do clone 3D7, revelou que o genoma deste parasita compreende cerca de 5300 genes distribuídos por 14 cromossomas. O DNA tem 23 mega-base (Mb) e apresenta um alto conteúdo de A-T (90%) em intrões e regiões intergénicas [34]. O estudo da estrutura codificante identificou cerca de 5.300 genes codificantes de proteínas, com uma densidade média de 1 gene por 4.338 pares de bases (bp). Os cromossomas do parasita são haploides durante todo o ciclo de vida em humanos e distribuídos ao longo da sequência do genoma. O material genético do *Plasmodium* encontra-se organizado em três genomas: 1) genoma mitocondrial, com 6kb, contém os genes que codificam as proteínas responsáveis pelo transporte de eletrões, 2) genoma apicoplasto, com 35kb, contém os genes que codificam principalmente rRNA, tRNA e proteínas ribossomais e 3) genoma nuclear, que comporta a maioria dos genes do parasita, incluindo os envolvidos na resistência aos antimaláricos. Os estudos genómicos permitem identificar os polimorfismos em genes do parasita e do hospedeiro humano e constituem uma orientação útil para a formulação de medicamentos e de vacinas contra a malária [34].

### I.6.1.1.3. Marcadores moleculares de resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos

Os marcadores moleculares são sequências de DNA específicas, que revelam determinadas características fenotípicas entre indivíduos geneticamente relacionados. Do ponto de vista estrutural, os marcadores moleculares representam segmentos de DNA que estão ligados a *locis* (posições) específicas que determinam características de interesse. Os mesmos podem ser evidenciados por diversas técnicas moleculares, tais como PCR-RFLP, microssatélites e sequenciação [35].

O uso de marcadores moleculares permite que o potencial genético de uma espécie seja determinado com maior precisão, mesmo antes da expressão do fenótipo.

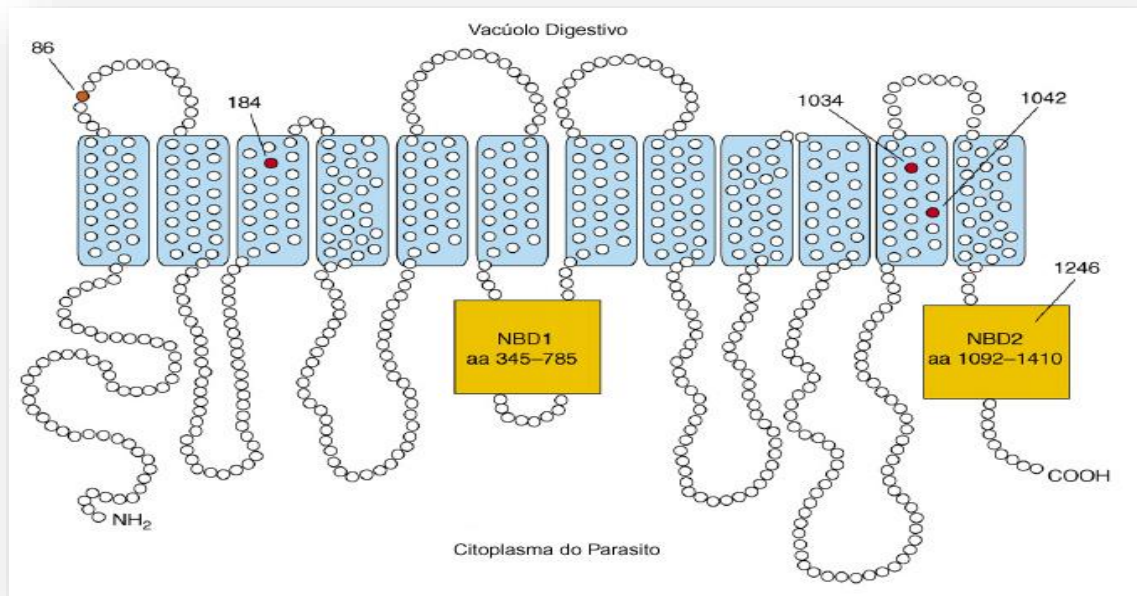
No presente estudo, foram analisados SNP's documentados dos genes *Pfmdr1* (N86Y e D1246Y) *Pfatp6* (S769N) e *PfK13* (Y493H, R539, I543 e T508N) considerados com marcadores moleculares associados à suscetibilidade do *P. falciparum* aos antimaláricos e SNP's em genes das famílias *CYP450* e *ABC1/MDR1* do humano, considerados marcadores moleculares associados à variabilidade no metabolismo de fármacos.

#### I.6.1.1.3.1. *Pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistant)

O gene *pfmdr1* está localizado no cromossoma 5 do *P. falciparum*; codifica para a *P-glicoprotein homologue 1* (Pgh1) ou PfMDR1, que é membro da superfamília ABC (*ATP-binding cassette*). De forma geral, as proteínas da família ABC estão implicadas no transporte de nutrientes e efluxo de xenobióticos através das membranas celulares, regulando a concentração intra e extra celular dos mesmos [36]. O gene *pfmdr1* codifica para a proteína PfMDR1, uma Pgh1 localizada na membrana do vacúolo digestivo do *P. falciparum* (figura I.10). SNP's neste gene, bem com o aumento do número de cópias do mesmo, têm sido associados com a modulação da suscetibilidade do parasita aos diversos antimaláricos, principalmente cloroquina, amodiaquina, mefloquina, e também aos derivados da artemisinina, pelo que são sugeridos como marcadores moleculares de resistência para esses fármacos [35, 37].

Em estudos laboratoriais, foi observado que, os clones mutantes de *P. falciparum* com alterações na proteína PfMDR1, tais como 86Y e 1246Y, estavam associados com uma diminuição da função transportadora dos substratos. Esta perda na capacidade de efluxo de substratos constitui uma vantagem para o parasita, se o fármaco tiver como alvo o vacúolo digestivo, como é o caso da cloroquina, do quinino e da artemisinina. Deste

modo, as estirpes portadoras de variantes mutantes não acumulam fármaco, apresentando menor citotoxicidade para o vacúolo digestivo e vantagem para a sobrevivência do parasita [38].



**Figura I.10.** Topologia da proteína PfMDR1; os pontos a vermelho indicam a localização dos aminoácidos polimórficos, associados à resposta alterada de *P. falciparum* a antimaláricos (adaptado de Sanchez *et al.*, 2010)

#### I.6.1.1.3.2. *PfATPase6*

O gene *pfATPase6* codifica para a proteína retículo sacro/endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase (PfSERCA) do *P. falciparum*. Esta proteína ( $\text{ATPaseCa}^{2+}$ ) tem a função de bomba reguladora do fluxo de cálcio no retículo endoplasmático do *Plasmodium*. Esta função parece ser inibida pela artemisinina, levando à alteração dos níveis de cálcio intracelulares e a homeostasia do parasita [39, 40].

Polimorfismos neste gene estão associados à alteração da sensibilidade do *P. falciparum* à artemisinina e seus derivados. Neste estudo, foram analisado o SNP no gene *pfATPase6* na posição S769N que consiste numa substituição de serina (Ser-AGT) por asparagina (Asn-AAT), tem sido associada com a diminuição da sensibilidade do *P. falciparum* à artemisinina [41].



Num estudo *in vitro* realizado em amostras provenientes da Guiana Francesa, foi demonstrada uma reduzida suscetibilidade à artemisinina em 6 de 7 amostras com a mutação 769N no gene *pfATPase6*. As amostras com mutações apresentavam valores de IC50 (concentração inibitória do fármaco necessária para matar 50% de parasitas) vinte vezes superior ao valor máximo apresentado por isolados de outras origens, envolvidos em estudos semelhantes. Este resultado reforça a ideia do envolvimento de SNP's do gene *pfATPase6* na resistência à artemisinina, pelo que, este gene foi sugerido como sendo marcador molecular de resistência do *P. falciparum* à artemisinina [39].

#### **I.6.1.1.3.3. *pfK13-propeller***

Mutações no domínio helicóide do gene *K13* do *P. falciparum* (*pfK13-propeller*) foram identificadas como marcadores moleculares de resistência do parasita à artemisinina [42]. Este gene está localizado no cromossoma 13 do *P. falciparum*; codifica para PfK13 que é uma proteína da superfamília Kelch, cujo domínio helicóide contém sítios de interação com várias proteínas que participam em diversas funções celulares, incluindo a regulação de proteínas implicadas na degradação da ubiquitina e na resposta ao stress oxidativo. Mutações no gene *K13*, principalmente nos codões 493, 539, 543 e 580, têm sido associadas com um tempo prolongado da eliminação da parasitemia, após administração da artemisinina em ensaios clínicos; e, num estudo *in vitro* em amostras oriundas do Camboja e Tanzânia, utilizando a técnica de RSA (*Ring- stage Survival Assay*), foi observado um aumento considerável da taxa de sobrevivência de trofozoítos [42]. Essas observações sugeriram que mutações no gene *K13-Propeller*, especialmente nos *loci* 493(Y>H), 539(R>T), 543(I>T) e 580(C>Y), afetam a suscetibilidade do *P. falciparum* e são extremamente relevantes na resistência do parasita à artemisinina [42, 43].

### **I.7. Polimorfismos em genes do hospedeiro humano**

A farmacogenética desempenha um papel determinante na resposta terapêutica aos fármacos [44]. No humano, determinados SNP's podem afetar a farmacocinética e dar origem à formação de subgrupos populacionais, classificados de acordo com a sua variabilidade na capacidade de metabolizar os substratos, incluindo fármacos, em: a)

metabolizadores lentos ou pobres (*poor metabolizers* - PM), geralmente portadores de variantes alélicas associadas com proteínas de baixa atividade catalítica, têm tendência para acumular níveis plasmáticos de fármaco superiores ao esperado, podendo ocorrer toxicidade; porém, se o substrato administrado for um pró-fármaco, o PM poderá estar em risco de falha terapêutica, uma vez que o composto administrado necessita de metabolização para gerar o composto ativo; b) o metabolizador rápido (UEM / *ultra extensive metabolizer*) apresentará níveis mais baixos de fármaco (sub-terapêuticos), a partir de uma dosagem de referência, uma vez que o princípio ativo é precocemente formado e eliminado; c) enquanto o metabolizador extensivo (*extensive metabolizer*, EM), geralmente portador do alelo selvagem, apresentará níveis de expressão ou de atividade adequados. De entre os fatores que influenciam a variabilidade fenotípica na farmacocinética dos antimaláricos, constam os SNP's em genes codificantes de *CYP450* e *ABCI/MDR1* do humano, documentados como marcadores moleculares associados ao metabolismo de fármacos [44, 45].

### **I.7.1. Marcadores moleculares associados ao metabolismo de fármacos**

#### **I.7.2. SNP's em genes da superfamília Citocromo P450 (*CYP*)**

Os genes *CYP450* codificam para diferentes enzimas da superfamília citocromo, no humano, estas enzimas *CYP450* estão localizadas em maior quantidade nas células microssomais do fígado, sendo também expressas noutros tecidos, nomeadamente o trato gastrointestinal, pulmões e rins.

As enzimas das famílias *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* participam na fase I do metabolismo de cerca de 80% dos fármacos de uso clínico, enquanto as outras famílias estão envolvidas principalmente no metabolismo de componentes endógenos [28, 46].

Neste estudo, foram analisados SNP's em genes *CYP3A4 / CYP3A5* e *ABCI* por causa do seu envolvimento no metabolismo da combinação AL e os SNP's nos genes *CYP1A1*, *CYP1B* e *CYP2C8*, devido à sua participação no metabolismo da amodiaquina, componente de ACT's em uso em Angola.

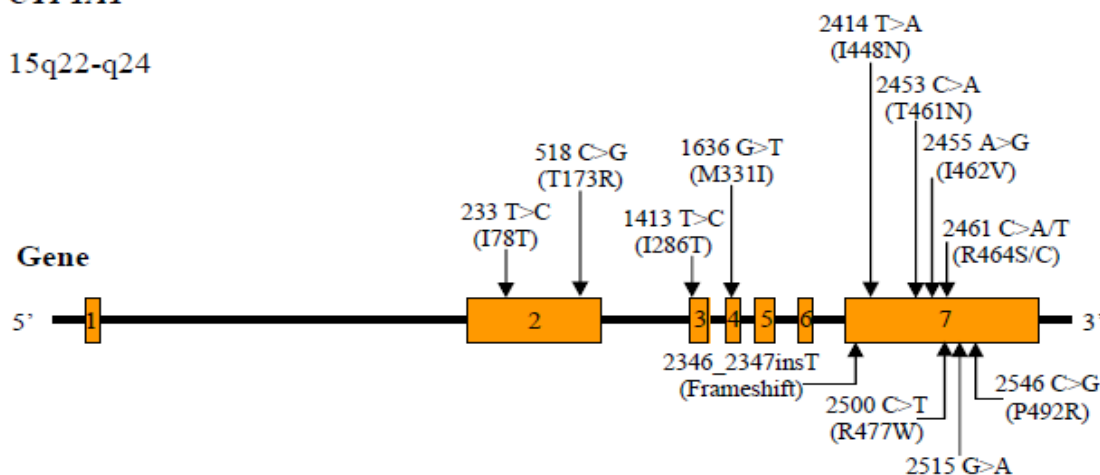
### I.7.1.1. *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* está localizado no cromossoma 15q22-q24. Contém sete exões, seis intrões e 5.810 pares de bases (Figura I.14). Este gene codifica para a enzima CYP1A1, encontrada principalmente em tecidos extra-hepáticos, incluindo tecidos cardíaco, pulmonar, intestinal e nos linfócitos [28][46]. O *CYP1A1* é polimórfico, apresentando SNP's com cerca de 15 variantes alélicas identificadas, dos quais a *CYP1A1*\*2B, caracterizada por uma substituição do aminoácido Ile462Val (2455G>A) no exão 7, que codifica para uma proteína com atividade enzimática acentuada [47][48]. O *CYP1A1* parece ter menor relevância no metabolismo de fármacos, devido ao padrão não hepático da enzima que codifica, todavia, apresenta importância clínica significativa em áreas endémicas de malária pela sua participação no metabolismo da amodiaquina, estando também reportada a sua participação no metabolismo dos antimaláricos quinino e cloroquina, demonstrado em estudos *in vitro* [48].

Neste estudo, foi analisado o SNP do gene *CYP1A1* na posição 2455 A>G que envolve a variante alélica *CYP1A1*\*2B, considerado relevante na metabolização de antimaláricos, particularmente a amodiaquina [49].

#### *CYP1A1*

15q22-q24

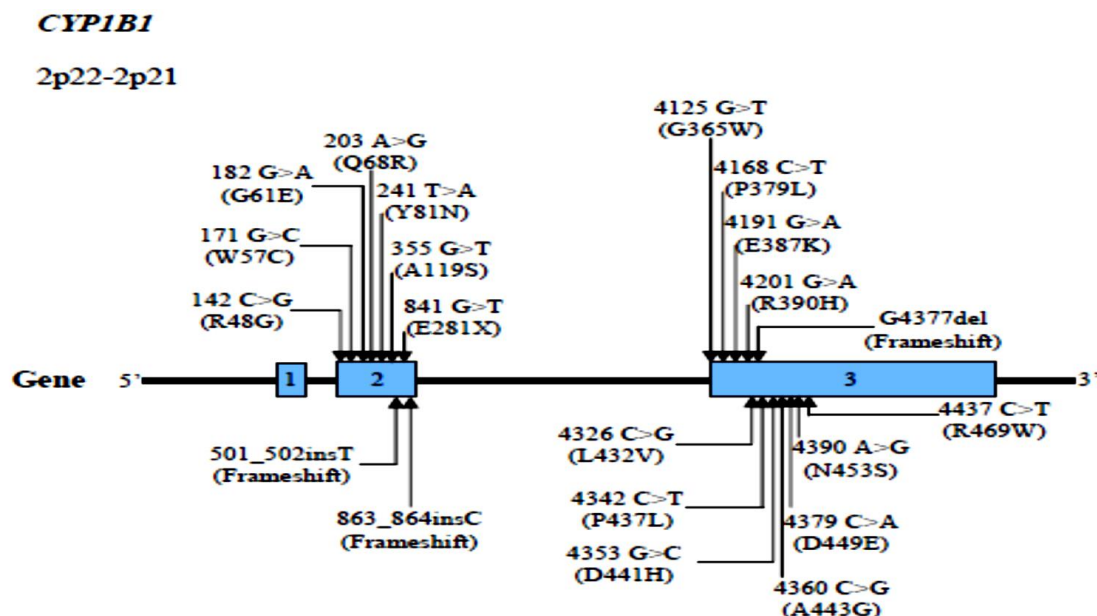


**Figura I.14.** – Estrutura do gene CYP1A1 (<http://www.ensembl.org/>). O códon de iniciação ATG está perto da extremidade 5' do exão 2, produzindo uma proteína de 512 aminoácidos

### I.7.1. 2. CYP1B1

O gene *CYP1B1*, localizado no cromossoma 2, é composto por três exões com a região de leitura (ORF) (Figura I.15); codifica para enzima (CYP1B1) que tem uma expressão predominantemente extra-hepática, encontrada em diferentes tecidos do organismo, incluindo sangue periférico e rins. Esta enzima está também envolvida em diferentes funções fisiológicas, incluindo a participação no metabolismo de substratos endógenos, tais como o esteroide 17  $\beta$ -estradiol, testosterona e progesterona [47, 48].

Considera-se que determinadas mutações no gene *CYP1B1* desempenham um papel relevante na ativação de compostos pro-carcinogénicos, tais como HAP, arila e aminas heterocíclicos, e de metabólitos reativos que causam danos ao DNA [45]. Foram identificadas cerca de 26 mutações polimórficas no *CYP1B1* em seres humanos, sendo 19 associadas com alterações na sequência de aminoácidos. Entre as mais documentadas estão as variantes alélicas *CYP1B1*\*3 (4326G>C) que consiste numa substituição de aminoácido *Leu432Val* e *CYP1B1*\*5 (4360G>C), substituição *Ala443Gly*, analisadas neste estudo. As mesmas codificam para proteínas com expressão enzimática diminuída em comparação com o alelo selvagem (*CYP1B1*\*1) e, têm sido associadas ao metabolismo de fármacos antimaláricos, com realce para a amodiaquina [47, 49].



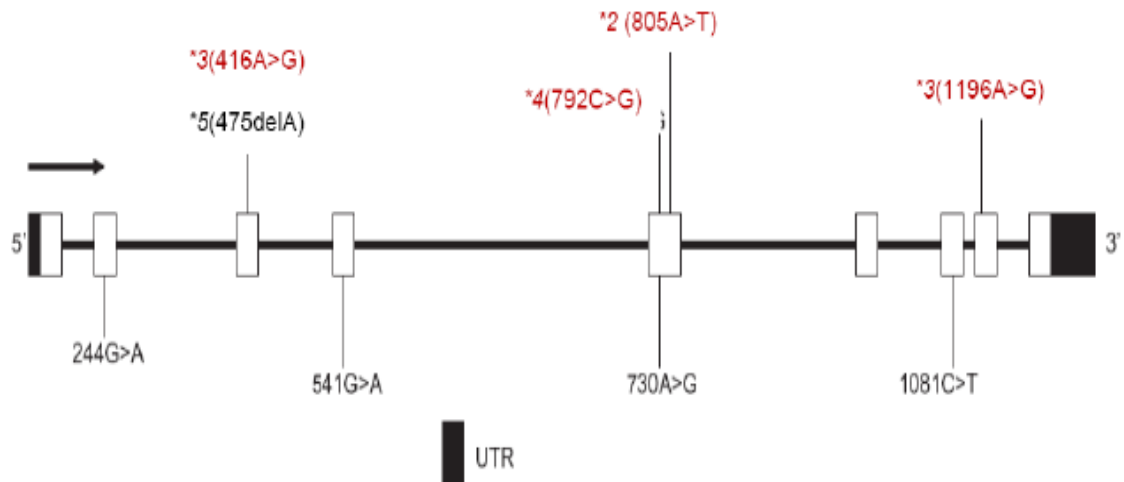
**Figura I.15.** - Estrutura do gene *CYP1B1* tem 12Kb e contém três exões (<http://www.ensembl.org/>). A tradução começa perto da extremidade 5' do segundo exão produzindo uma proteína de 543 aminoácidos.

### I.7.1.3. CYP2C8

O gene *CYP2C8*, com 31 kb, é um dos quatro membros da subfamília *CYP2C* está localizado no cromossoma 10q24; é constituído por nove exões; codifica para uma enzima (CYP2C8) composta por 490 aminoácidos (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c8.htm>) (Figura I.16). A enzima CYP2C8 representa cerca de 7% do total das enzimas CYP450 hepáticas, também encontrada em vários tecidos extra-hepáticos, tais como intestino, rins, cérebro e coração, assim como em tumores de cancro da mama. Esta enzima está envolvida no metabolismo de substratos endógenos e de vários fármacos, incluindo antimaláricos, principalmente a amodiaquina e o quinino. Além da variante selvagem (*CYP2C8\*1A*) que apresenta expressão e atividade normal da enzima CYP2C8, este gene compreende as variantes alélicas *CYP2C8\*2* (805T), *\*3* (416G e 1196G) e *\*4* (792G) que codificam para enzima de atividade alterada [47].

O gene *CYP2C8*, em conjunto com *CYP1A1* e *CYP1B1* têm sido sugeridos como potenciais marcadores farmacogenéticas e ferramentas de farmacovigilância em esquemas terapêuticos contendo AQ, para identificação de indivíduos com uma predisposição genética para efeitos colaterais (por exemplo, portador de 2C8 \* 2 / \* 2).

A importância do CYP2C8 no âmbito deste trabalho reside na sua participação no metabolismo de antimaláricos, principalmente a amodiaquina. Considera-se que a CYP2C8 em conjunto com CYP1A1 e CYP1B1 participa na biotransformação de AQ e DEAQ em quinine-imine (QI), um metabolito tóxico deste antimalárico [47, 50]. Tem sido reportada, embora de uma forma muito esporádica (aproximadamente 1:2000), casos com efeitos adversos caracterizados por neutropenia e insuficiência hepática grave, supostamente associado ao QI [46][49].



**Figura I.16** - Estrutura de gene CYP2C8 representando os diferentes SNP's, analisados neste estudo (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

#### I.7.1.4. CYP3A4 e CYP3A5

No humano, a subfamília de genes *CYP3A* está localizada no cromossoma 7q21-q22.1, e tem cerca de 220 kb e é composta de quatro genes: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43*, que codificam para as enzimas correspondentes [51, 52].

O *CYP3A4* é constituído por 13 exões, 12 intrões e codifica para uma proteína de 502 aminoácidos (Figura I.17), sendo o *CYP3A5* composto pelo mesmo número de exões e intrões e também codifica para uma proteína com 502 aminoácidos (Figura I.18) [28, 53]. As enzimas *CYP3A4* e *CYP3A5* partilham uma analogia na sequência de aminoácidos de aproximadamente 85%; no entanto têm diferenças ao nível da atividade catalítica e seletividade para substratos com base na sua região recetora [44]. Estas isoformas representam a mais abundante porção do sistema CYP450 localizado no fígado [53]. As mesmas apresentam uma sobreposição na especificidade dos seus substratos, o que dificulta a sua distinção em termos da função metabolizadora. Estão envolvidas no metabolismo hepático e intestinal de diversos substratos endógenos e exógenos e na biotransformação de cerca de 50% dos medicamentos prescritos, incluindo antibióticos, fármacos anti-retrovirais e antimaláricos [44].

Os genes *CYP3A4* e *CYP3A5* exibem um número considerável de polimorfismos (SNP's), com cerca de 20 variantes alélicas já identificadas no *CYP3A4* e 11 no *CYP3A5* (<http://www.cypalleles.ki.se>). Entre as mais documentadas, e que codificam para

proteínas com atividade enzimática alterada, constam a variante *CYP3A4\*1B*, caracterizadas pela substituição do nucleótido A para G no *locus* 392 do gene *CYP3A4* e a variante *CYP3A5\*3C* uma mutação 6896G>A do gene *CYP3A5* [52].

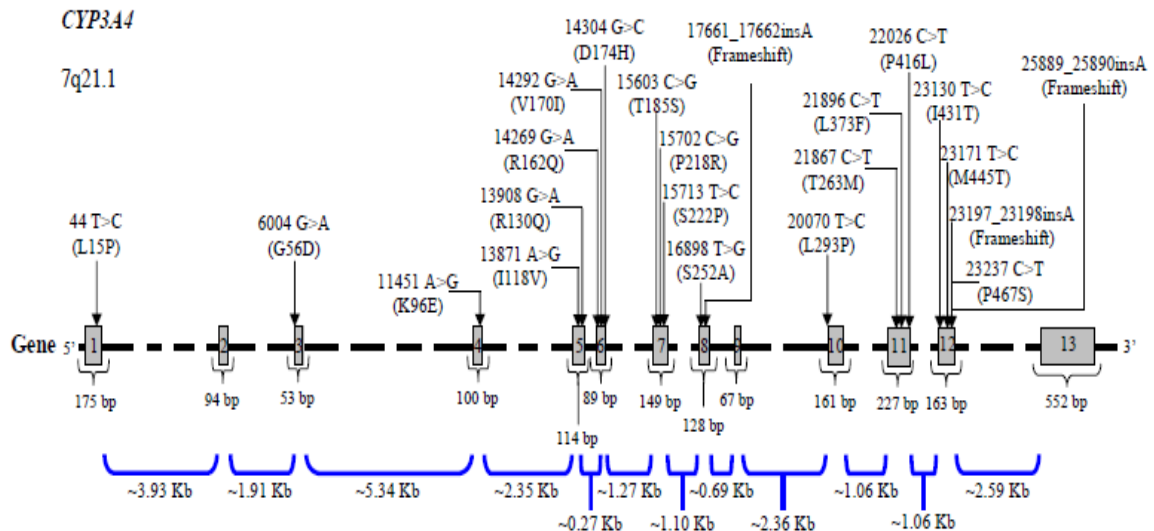
Em relação ao *CYP3A4\*1B* foi reportado, em diferentes estudos, que os indivíduos portadores da variante alélica *CYP3A4\*1B* apresentam uma metabolização acentuada dos substratos em comparação com os portadores do genótipo selvagem *CYP3A4\*1/\*1*; o que sugere que o alelo mutante (*CYP3A4\*1B*) codifique para uma enzima (*CYP3A4*) de atividade acentuada. Em ensaios *in vitro*, foi observado uma acentuada transcrição da *CYP3A4* no alelo mutante, o que sugere que esta variante codifica para uma proteína com atividade enzimática acentuada mesmo *in vivo* [44]. Os resultados de um estudo sobre o impacto de polimorfismos no gene *CYP3A4* na farmacocinética da ciclosporina sugerem que o alelo mutante (*\*1B*) codifica para uma proteína com atividade enzimática aumentada. Nesta situação, os portadores do alelo mutante terão tendência para metabolizar e eliminar rapidamente os substratos, o que resultará em baixas concentrações dos fármacos e risco para falhas terapêuticas [51, 54].

Para o gene *CYP3A5*, o genótipo mutante (*CYP3A5-6986G*) ou *CYP3A5\*3* é a variante alélica mais documentada, considerada ser associada com alteração da proteína (*CYP3A5*) codificada, com atividade enzimática muito reduzida ou mesmo sem atividade. Os portadores da *CYP3A5\*3* metabolizam os substratos de forma lenta (PM) resultando em excreção diminuída, elevadas concentrações dos substratos e risco de ocorrência de efeitos tóxicos [54].

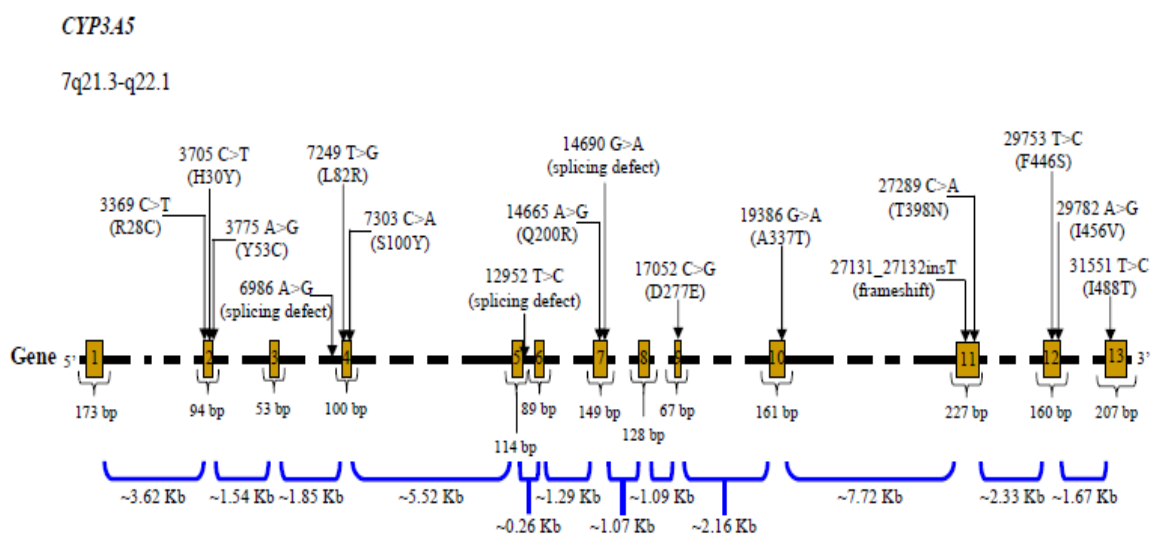
Além da ação moduladora dos recetores nucleares (PXR, CAR) a expressão dos genes *CYP3A4/5* e a atividade das enzimas codificadas são também influenciadas por fatores não genéticos incluindo: efeito indutor/inibidor de fármacos, causas dietéticas, hormonais ou patológicos.

De forma geral, os polimorfismos (SNP's) nestes genes apresentam uma distribuição variável entre os grupos populacionais, com tendência para a predominância do alelo mutante (*CYP3A5\*3*) em populações brancas (82 – 96%), tendo sido observado diferenças significativas associadas à distancia ao equador. Um estudo genético comparativo reportou frequências na ordem de 6% na população Yorubas na Nigéria e 96% em caucasianos dos países Baixos; em média, foram reportadas em estudos de diferentes populações as seguintes frequências para *CYP3A5\*3*: Negros americanos (33%), Japoneses (85%), Chineses (67%), Mexicanos (75%) e 67% em populações Sudeste Asiáticas (excluindo Japão e China) [55].

Estes genes foram alvo de análise deste estudo por apresentarem SNP's que influenciam a variabilidade no metabolismo e na farmacocinética da combinação AL, que afeta a resposta terapêutica [56].



**Figura I.17.** - O gene *CYP3A4*, constituído por 13 exões em 26,5 Kb; apresenta os diferentes intrões e exões e a localização dos SNP's (<http://www.cypalleles.ki.se>).

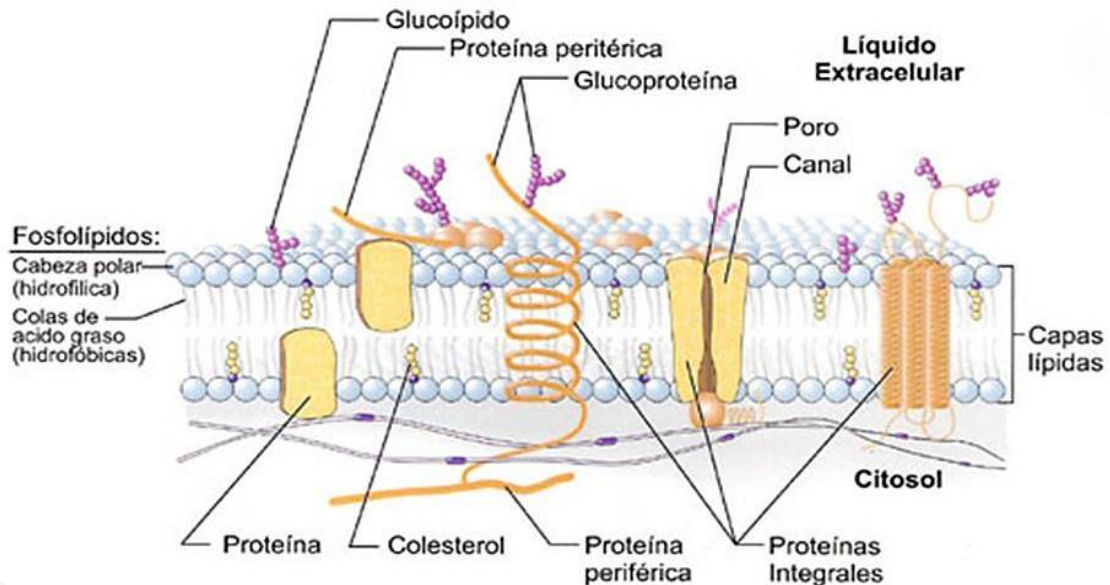


**Figura I.18.** – Gene *CYP3A5*, constituído por 13 exões que dão origem a uma proteína com 57,1 kDa, o SNP (6986 A > G) está localizado no intrão 3. (<http://www.cypalleles.ki.se/>).



## I.7.2. SNP's em genes da superfamília ABC1 / MDR1

### I.7.2.1. Proteínas transportadoras de membrana



**Figura I.19.** – Estrutura da membrana celular, ilustrando a posição da glicoproteína ([http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/images/a/aa/Cell\\_membrane.png](http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/images/a/aa/Cell_membrane.png)). Acesso em: 16/05/2016.)

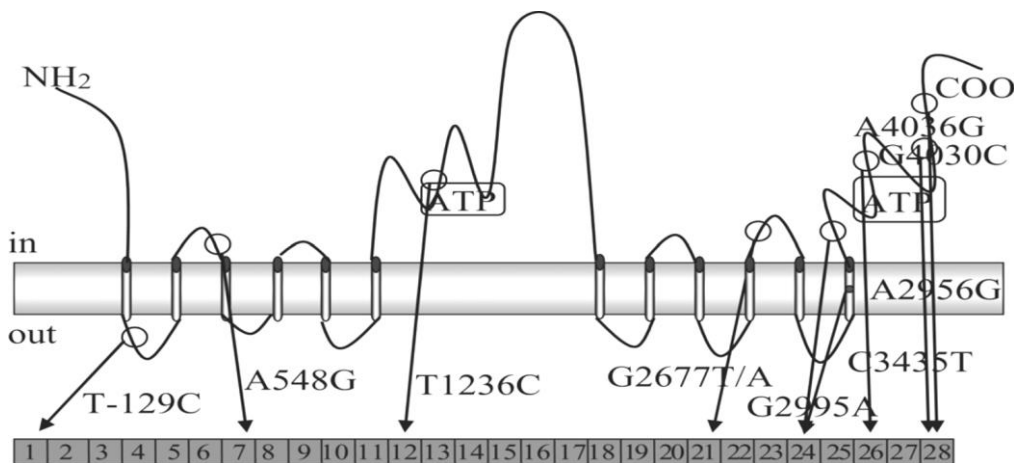
#### I.7.2.1.1. MDR1 (*multi drug resistance*)

O gene *MDR1* está localizado no cromossoma 7, na banda p21-21.1; o seu cDNA abrange cerca de 4,5 kb, com 28 exões variando em tamanho entre 49 e 587 bp. O *MDR1* codifica para P-glicoproteína1 (P-gp1) que é um polipeptídeo com 1280 aminoácidos e uma massa molecular de cerca de 170 kDa [51].

A P-glicoproteína1 pertence à família de ABC / MDR (*ATP- Binding Cassette*), tem a função de transportar os seus substratos através de membranas celulares, dependentes da hidrólise de ATP; é encontrada em organismos procariotas e eucariotas [57, 58]. No humano, a P-gp encontra-se em diversos tecidos incluindo o hepático e intestinal, onde participa na excreção ou retenção seletiva de substratos, influenciando a concentração de inúmeros compostos endógenos e exógenos nas células e no sangue. Os substratos da P-

gp abrangem diversas classes de fármacos, dos quais os antimaláricos, nomeadamente a cloroquina, a amodiaquina, o quinino, a mefloquina e a artemisinina [59, 60].

O gene *MDR1* é bastante polimórfico, apresentando diferentes mutações (SNP's) associadas à variação do nível da expressão do gene e da atividade da proteína codificada (Figura I.20). Entre os SNP's mais documentados e associados à P-gp de função alterada, encontram-se as posições --129T>C e 3435C>T [56], analisados neste trabalho.



**Fig. I.20.** – Estrutura do gene *MDR1* humano, com ilustração da posição dos principais SNP's - 129T>C e 3435C>T na região promotor e o na exão 28 respetivamente (adaptado de Li Yang-Hong et al, 2006)

O SNP *MDR1* -129T>C é uma substituição do nucleótido timina (T) pelo citosina (C) nesta posição, encontrada na região promotora do gene *MDR1*. Trata-se de um polimorfismo silencioso, que não causa alterações na estrutura da proteína codificada, porém, torna a região promotora fraca, com velocidade de transcrição diminuída. A mutação neste *locus* tem sido associada à alteração do nível de expressão do *MDR1* e à P-gp com a função transportadora diminuída [58, 61]. Foi observado, em estudos farmacocinéticos, que os indivíduos portadores do genótipo heterozigótico (T/C) apresentam níveis de expressão da P-gp cerca de duas vezes mais baixo do que em portadores do genótipo (TT), no entanto, existem estudos onde não foi observado associação significativa entre os genótipos do *MDR1* e os níveis da atividade da P-gp [58, 61].

O SNP C3435T, do gene *MDR1* encontrado no exão 26; consiste na substituição do nucleótido citosina (C) pelo timina (T), e é um polimorfismo silencioso, não ocorrendo alteração do aminoácido na posição correspondente, com manutenção da isoleucina (Ile) na posição 1145. Apesar de ser um polimorfismo silencioso, têm sido observadas alterações da atividade da P-gp em estudos efetuados sobre este SNP [58, 61]. Em estudos farmacocinéticos foram observados níveis da atividade da P-glicoproteína duas vezes mais baixos em indivíduos portadores do genótipo mutante (*TT*), em comparação com os portadores do genótipo selvagem (*CC*), apresentando os heterozigóticos um fenótipo intermédio [61].

## **I.8. Malária em Angola**

A República de Angola encontra-se situada na costa ocidental da África Austral, a Sul do Equador, entre os paralelos 4° 22' e 18° 02'. É o sexto País Africano de maior dimensão, com uma área de cerca de 1.246.700 km<sup>2</sup>, uma costa de 1.650 km e uma fronteira terrestre de 4.837 km, limitado a Norte, pela República do Congo, Brazzaville e República Democrática do Congo, a Leste pela Zâmbia, a Sul pela Namíbia e a Oeste pelo Oceano Atlântico, abrangendo ainda a Província de Cabinda, situada a Norte, entre o Congo-Brazzaville e a República Democrática do Congo, a sua capital é a cidade de Luanda [62]. O país está dividido entre uma faixa costeira árida, que se estende desde a Namíbia até Luanda, um planalto interior húmido, uma savana seca no interior a sul e sudeste, e floresta tropical no norte e em Cabinda.

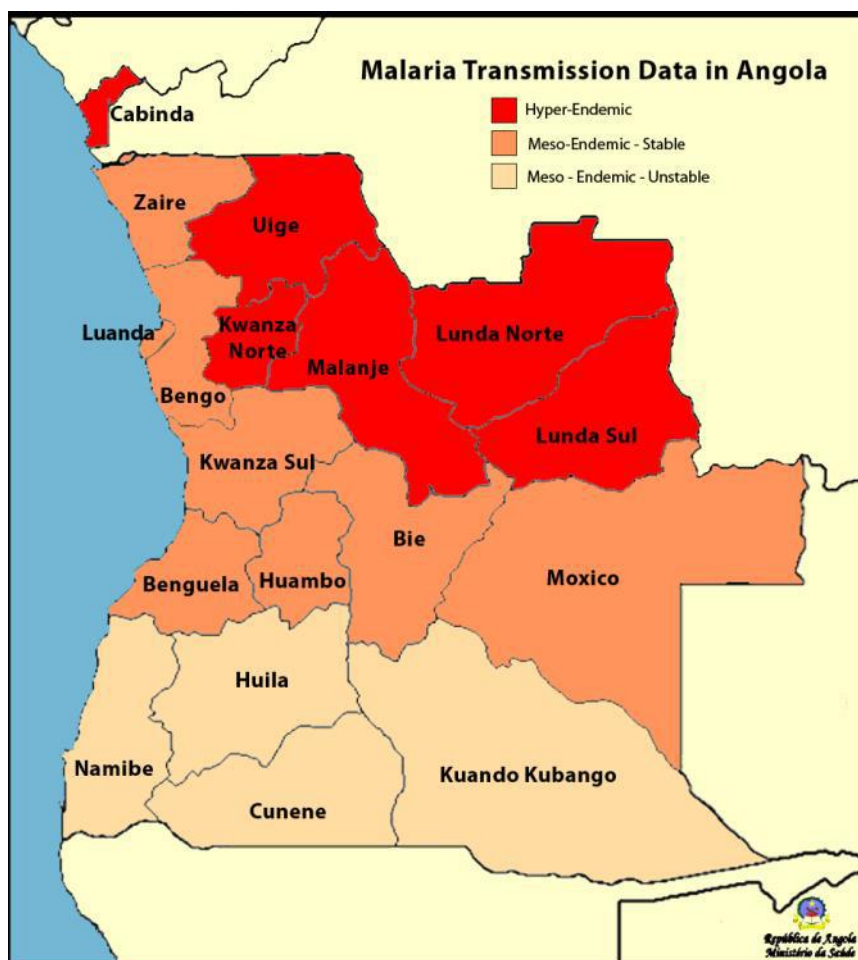
Administrativamente, Angola tem 18 províncias (figura I.21), com a população global estimada em 26.000.000 de habitantes [62].

O quadro epidemiológico do País é caracterizado por doenças infecciosas transmissíveis com destaque para as grandes endemias, como malária, VIH/SIDA e tuberculose e as doenças tropicais negligenciadas, como tripanossomose humana Africana, filarioses e geo-helminthoses. Estão presentes também, as doenças respiratórias agudas e as diarreicas agudas, bem como doenças passíveis de prevenção através de vacinação, como o sarampo [62].

A malária continua a ser o maior problema de saúde pública em Angola; toda população está sob risco de contrair a doença. A mesma, representa 25% das necessidades dos

cuidados de saúde, 20% de internamentos hospitalares, 40% de mortes perinatais, 25% de mortes maternas e a maior causa de absentismo laboral e escolar. O *P. falciparum* é responsável por cerca de 92% dos casos e é a principal espécie implicada nas formas graves e complicadas. O *P. vivax* é responsável por cerca de 5 a 7% dos casos e o *P. malariae* tem representado menos de 1% dos casos registados.

De acordo com o perfil de transmissão da malária, o estrato de alta transmissão (hiperendémica) corresponde às províncias de Cabinda, Uíge, Malange, Lunda Norte e Lunda-Sul; o de transmissão moderada estável (mesoendémicas estáveis) corresponde às províncias de Luanda, Zaire, Bié, Huambo, Benguela, Moxico, Kwanza-Norte, Bengo; o estrato de transmissão moderada instável (mesoendémica instável) corresponde às províncias do Namibe, Huila, Cunene e Kuando Kubango. As diferentes áreas de risco epidémico de Angola encontram-se ilustradas na figura I.21.



**Figura I.21.** – Perfil de endemicidade de malária em Angola (Atlas geográfico de Angola)

Em 2006, com base nos resultados dos estudos de eficácia terapêutica, foi adotada a combinação Artemeter + Lumefantrina (Coartem®) como fármaco de 1ª linha, em substituição da cloroquina. Com a implementação de intervenções integradas, o Programa Nacional de Controlo de Malária (PNCM) reportou uma redução substancial das taxas de morbilidade e mortalidade. No período de 2005 a 2015, foi observado um decréscimo de óbitos atribuídos à malária, tendo sido reportado 13.763 óbitos em 2005, 8.114 em 2010 e 15.997 em 2016 (relatório PNCM 2016\*). Apesar dos progressos registados, a malária continua a ser o maior problema de saúde pública [2].

A tabela 1.4. ilustra os sobre casos e óbitos por malária de 2014 a 2017.

\* de salientar que neste ano ocorreu um surto epidémico de malária no país.

**Tabela 1.4. Casos e óbitos registados de acordo com os métodos de diagnóstico, 2014 – 2016. Fonte: relatório OMS sobre malária, 2017.**

Casos / óbitos (n)	Anos		
	2014	2015	2016
População sob risco de malária			28.813.475
Presumidos e confirmados	3.180.021	3.254.270	4.301.146
Examinados ao MO	3.398.029	3.345.693	4.183.727
Confirmados ao MO	1.431.313	1.396.773	2.508.128
Examinados com TRD	1.855.400	3.009.305	2.959.282
Confirmados com TRD	867.666	1.372.532	1.736.125
Óbitos	5.714	7.832	15.997

n = número

Com base no panorama nacional, foi realizado o presente estudo, que contempla fatores associados ao parasita, bem como à metabolização de fármacos no hospedeiro humano, como contributo para a monitorização da resistência a antimaláricos em Angola.

O estudo está focado na avaliação da eficácia da combinação terapêutica AL, com a avaliação das frequências dos *SNP's* em genes do *P. falciparum* (*pfmdr1*, *pfATP6* e *pfK13*), escolhidos com base nas suas associações com alterações da suscetibilidade do parasita aos antimaláricos previamente reportadas, e avaliação de *SNP's* em genes do hospedeiro humano, componentes das subfamílias de *CYP450* e de *ABC/MDR*,

selecionados devido ao seu envolvimento na metabolização dos antimaláricos, incluindo os componentes da combinação à base de artemisinina em estudo.

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo, efetuar uma pesquisa em amostras de sangue colhidas em Angola, em doentes infetados por *P. falciparum* e tratados com a combinação artemeter + lumefantrina, com o fim de avaliar a resposta terapêutica *in vivo* e associar estes dados com determinados polimorfismos reconhecidos como marcadores moleculares, nos genes *pfmdr1*, *pfatp6* e *K13-Propeller* do parasita, assim como nos genes codificadores de enzimas da superfamília CYP450 e de proteínas transportadoras P-gp/ MDR do hospedeiro humano.

## **I.9. Objetivo Geral**

Estudar polimorfismos genéticos no *Plasmodium falciparum* e no hospedeiro humano e verificar a existência de associação com a resposta terapêutica à combinação à base de artemisinina utilizada.

### **I.9.1. Objetivos Específicos**

- 1) Analisar a resposta clínica e parasitológica em pacientes com malária não complicada, após tratamento com a combinação artemeter + lumefantrina e seguimento até ao 28º dia;
- 2) Determinar as frequências de polimorfismos, nos genes associados à resistência a antimaláricos em *Plasmodium falciparum* (*pfmdr1*, *pfatp6* e *K13*) e, também avaliar o número de cópias no gene *pfmdr1* nas amostras em estudo.
- 3) Determinar as frequências, na população humana em estudo, dos SNP's conhecidos nos genes *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP1B1*, *CYP2C8*, *MDR1*, associadas a alterações na metabolização e transporte de fármacos;
- 4) Avaliar a associação da resposta terapêutica à combinação AL, com as frequências dos SNP, nos genes estudados referidos em 2 e 3.

## **II. Material e métodos**



## **II.1. Material**

### **II.1.1. Material biológico**

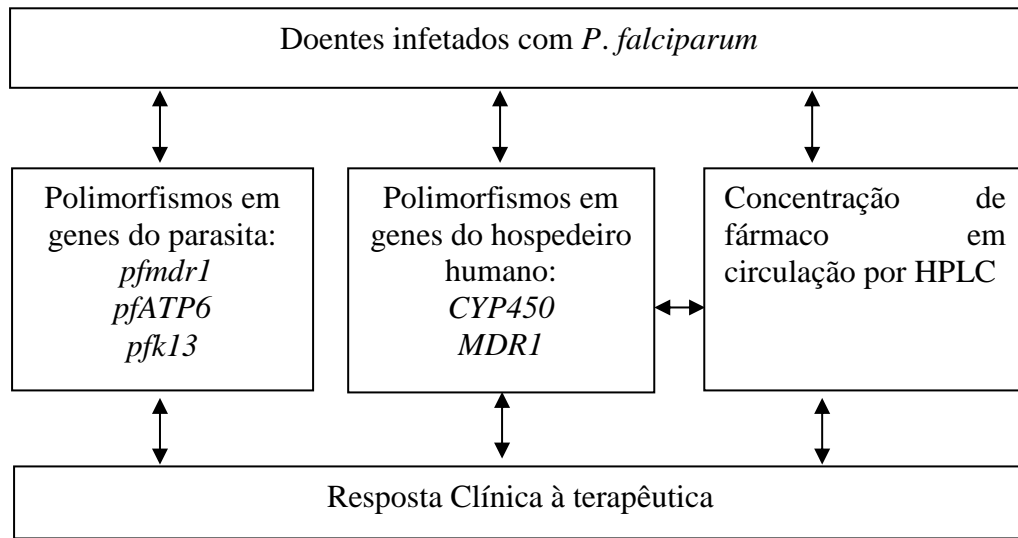
Amostras de sangue periférico colhidas em Angola de pacientes infetados com *P. falciparum*, os quais cumpriram os critérios de inclusão em estudos de eficácia terapêutica indicados pela OMS, descritos na sessão II.3.2.4. [8].

DNA de clones de *P. falciparum*, 3D7 e Dd2, com diferentes perfis de suscetibilidade à cloroquina, o clone 3D7 sensível e o Dd2 resistente a este fármaco [33]. Este DNA foi utilizado como controlo nas reações de PCR e PCR-RFLP durante as análises moleculares dos polimorfismos nos genes do parasita [34].

DNA total de caucasianos e negros, utilizadas como controlos nas reações de PCR e PCR-RFLP durante as análises moleculares dos polimorfismos em genes do hospedeiro humano, codificadores de proteínas transportadoras e metabolizadores.

Este trabalho compreende 3 capítulos (tabela II.1) cuja análise da associação entre os resultados obtidos fornece informação relevante para a compreensão de aspetos referentes à genética do *P. falciparum* e do hospedeiro humano e sua associação à resposta terapêutica a fármacos antimaláricos, em Angola:

- a) Análise da frequência de polimorfismos genéticos do parasita e sua associação à resposta ao AL;
- b) Análise da frequência de polimorfismos em genes do Homem de transporte e metabolização de fármacos;
- c) Quantificação por HPLC dos fármacos e/ou seus metabolitos em circulação no sangue.

**Tabela II.1.** Componentes do estudo


## II.2. Considerações Éticas

O estudo foi submetido e teve a aprovação do Comité de Ética do Ministério da Saúde de Angola (documento em anexo II.1.), foram ainda obtidas autorizações éticas das instituições envolvidas nas colheitas (anexo II.2.).

A Comissão Nacional de Proteção de Dados em Portugal, dispensou este trabalho de notificação deste órgão, uma vez que a seleção dos pacientes e colheita de amostras biológicas foi efetuada em Angola, este estudo não requer a notificação da CNPD, requer apenas o cumprimento dos requisitos da lei angolana, os quais foram cumpridos.

Em todos os momentos da implementação dos protocolos do estudo as normas de biossegurança, a saúde e o bem-estar dos pacientes foram assegurados.

Foi garantida a confidencialidade dos dados dos sujeitos incluídos, tendo os pacientes o direito de se retirar do estudo por qualquer razão até à fase de escrita e publicação dos resultados. Após a análise dos resultados, todos os dados foram anonimizados de forma irreversível. As amostras serão destruídas após a conclusão de todos os trabalhos e publicação dos mesmos.

Aos indivíduos passíveis de inclusão no estudo, por cumprirem os critérios abaixo descritos, foram explicados os objetivos do trabalho e os respetivos procedimentos, tendo posteriormente sido obtido consentimento informado assinado (modelo apresentado no anexo II.3.). Este estudo não incluiu crianças com idades inferiores a 6 meses, nem pacientes com quadro clínico grave.

## **II.3. Estudo da resposta terapêutica à combinação AL**

### **II.3.1. Cálculo do tamanho da amostragem**

A dimensão da população do estudo foi estimada com base no protocolo da OMS 2009 [8], para estudos de eficácia terapêutica de antimaláricos. De acordo com a recomendação do grupo técnico de peritos em quimioterapia de malária em 2008, o cálculo da amostra é baseado na proporção esperada de falhas terapêutica na população em estudo, tendo em consideração o nível de confiança estimado de 95% e o grau precisão de 5%. Para estudos de eficácia que envolvem um único fármaco, tal como no estudo aqui apresentado, para que o estudo seja considerado representativo é necessário no mínimo 73 pacientes, no entanto, de acordo com as *guidelines* da OMS, é recomendado adicionar 20% ao tamanho inicial da amostra, para compensar eventuais perdas durante o processo de seguimento. Pelo que a amostra necessária para que o presente estudo fosse estatisticamente significativo é de 88 indivíduos [8].

### **II.3.2. Análise estatística**

Os dados sobre a resposta terapêutica ao AL e sobre frequências dos SNP's foram analisados usando o programa IBM SPSS versão 23. O teste do Qui quadrado ( $\chi^2$ ) e score Z (valores padronizados) foram utilizadas para determinar diferenças significativas entre os parâmetros analisados. Foram também utilizados os testes Bonferroni e o de Benjamini-Hochberg, para analisar as associações entre aos resultados terapêuticos à AL e as frequências dos polimorfismos nos genes do hospedeiro humano, bem como nos genes do parasita.

### **II.3.3. População de estudo**

#### **II.3.3.1. Locais de colheita**

A colheita de amostras foi realizada em Luanda, Angola, em 2011, 2012 e 2013, nos períodos de maior transmissão de malária (entre Fevereiro e Maio), em três unidades de saúde: (I) Hospital Divina Providência, unidade de saúde sob gestão da Igreja Católica, situado na área periurbana de Kilamba Kiaxi, a qual possui serviços de atendimento

ambulatório, internamento de pacientes e laboratório de diagnóstico bem equipado; (II) Clínica do Exército, situado na zona urbana da Maianga, na parte central da cidade de Luanda, pertence aos serviços de saúde das Forças Armadas e tem serviços de atendimento ambulatório, internamento e laboratório bem equipado; (III) Centro de Saúde do Instituto Superior Técnico Militar (ISTM), uma unidade de saúde da escola militar, situada na zona periférica de Luanda, também apresenta serviço de atendimento ambulatório e laboratório equipado. Os estudos moleculares foram realizados no laboratório de malária, da Unidade de Parasitologia, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical/UNL, em Lisboa, Portugal.

### **II.3.3. 2. Seleção de Pacientes**

Foram selecionados pacientes com idade superiores a seis meses, de ambos os sexos, independentemente da sua área de residência, que foram atendidos nas unidades de saúde acima mencionadas, por apresentarem quadro clínico sugestivo de malária e com exame de gota espessa positiva para *P. falciparum*.

#### **II.3.3. 2.1. Critérios de exclusão do estudo**

- a) Presença do qualquer sinal de perigo, de malária grave ou complicada;
- b) Presença de situações que originem febre causada por outras doenças que não seja apenas malária, nomeadamente pneumonia, sarampo, abscessos graves, ou outras doenças graves da pele, diarreia aguda grave com desidratação, otite média, outras doenças graves (meningite, TB, infeção por VIH) ou presença de malnutrição grave.

#### **II.3.3. 2.2. Critérios de inclusão no estudo**

- a) Doente com malária não complicada, militares e civis, incluindo crianças com idades superiores a 6 meses e peso não inferior 5 kg;
- b) Possibilidade de fazer medicação por via oral;
- c) Mono-infeção por *P. falciparum* com uma densidade parasitária entre 2.000 e 100.000 parasitas assexuados por microlitro de sangue;
- d) Temperatura axilar  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  ou história de febre nas últimas 24 horas;

- e) Ausência de sinais de perigo, ou ausência de sinais de malária grave e complicada de acordo com a definição da OMS [4];
- f) Hemoglobina superior a 5,0 g/dl;
- g) Ter a possibilidade de apresentar-se nos dias de controlo durante um período de 28 dias;
- h) Ausência de história de hipersensibilidade aos medicamentos em estudo;
- i) Consentimento do doente, dos pais ou acompanhantes de menores, após explicação dos procedimentos e objetivos do estudo.

#### **II.3.4. Colheita de amostras**

Após obtenção do consentimento informado assinado, aos pacientes incluídos, foi efetuada colheita de amostras de sangue por punção digital, nos dias de seguimento. No momento de cada colheita foram efetuados gota espessa e esfregaço de sangue, corados com Giemsa, para a pesquisa do *Plasmodium* por microscopia ótica [18]. A leitura das lâminas para o diagnóstico microscópico foi realizada nas unidades de seguimento, por técnicos de laboratório competentes e treinados para o estudo (registo efetuado conforme ficha no anexo II.4). Os resultados positivos por microscopia ótica foram sempre confirmados pelo investigador responsável pelas colheitas.

O sangue para análise molecular foi colhido por punção digital, para papel filtro Whatman® 4. As amostras foram identificadas, conservadas à temperatura ambiente em embalagens individuais, e transportadas para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), em Lisboa, Portugal, onde foi efetuada a extração de DNA e a análise molecular subsequente.

Após a colheita da amostra sanguínea, foi iniciado o tratamento dos pacientes, constituído por 4 comprimidos de AL (Coartem® Novartis, Basel Suíça) em dose única, no momento do diagnóstico, 4 comprimidos após 8 horas e, 4 comprimidos duas vezes ao dia (manhã e noite) em cada um dos 2 dias subsequentes (total de 24 comprimidos) para adultos; às crianças com <35 Kg, as doses foram ajustadas de acordo com o peso [4] (anexo II.5.).

Os pacientes foram submetidos a seguimento, com avaliação clínica e microscópica, durante 28 dias, tendo em cada dia de seguimento sido efetuada a colheita de sangue para análise microscópica e molecular com base no protocolo de estudo de eficácia da OMS [8], estando previsto que, aos pacientes que desenvolvessem sinais de malária grave

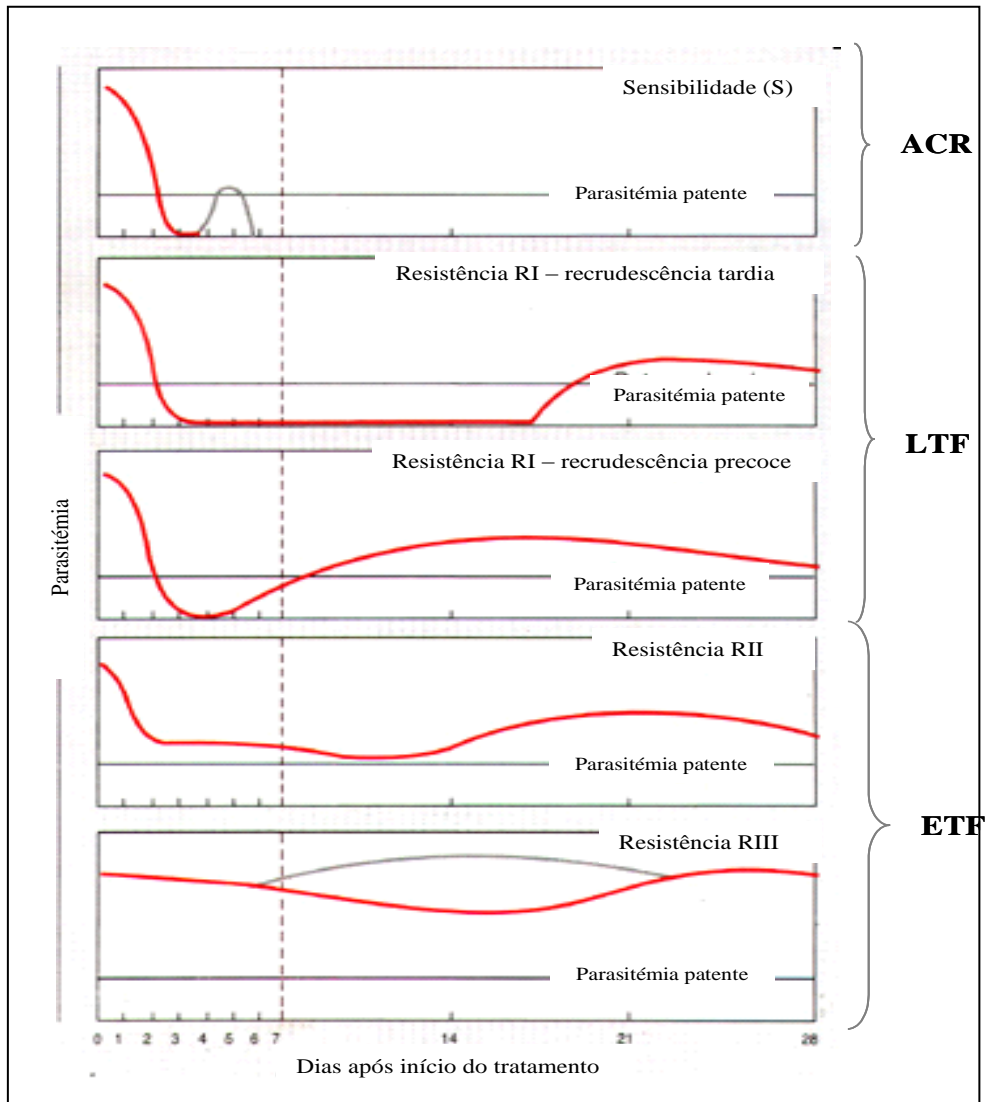
durante o seguimento seria imediatamente administrado o tratamento adequado à situação clínica, e consequentemente retirado do estudo.

Nos D0, D3 e D7, foram também colhidas amostras de sangue em papel filtro tratado com ácido tartárico, para o doseamento de fármacos por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência).

### **II.3.5. Classificação da resposta terapêutica**

A classificação da resposta terapêutica foi realizada de acordo com os critérios definidos no protocolo da OMS, para vigilância da eficácia de antimaláricos.

Em resumo, conforme apresentado na figura II.1 a classificação da resposta terapêutica foi efetuada em: 1) Falência Terapêutica Precoce (FTP / ETF), quando o paciente apresenta sinais de malária persistentes nos dias 1, 2 ou 3, mantendo a parasitémia; 2) Falência Terapêutica Tardia (FTT / LTF), em paciente com parasitémia no D7 ou nos dias seguintes, independentemente do seu estado clínico; 3) Resposta Clínica e Parasitológica adequada (RCPA / ACR), paciente sem parasitémia no D28 e sem outros critérios de falência terapêutica [8].



**Figura II.1.** Classificação da resposta terapêutica de acordo com a OMS (<https://www.malariasite.com/malaria/Res.jpg>) Parasitémia patente – comportamento da parasitémia.

Foram incluídos nesta avaliação, apenas os pacientes cujo seguimento foi completo; o que significa que os pacientes classificados como RCPA, tiveram seguimento (clínico e parasitológico) até D28; os classificados como FTT, terminaram o seguimento no período entre D7 e D28 e os FTP, terminaram o seguimento antes do D7 (ficha de avaliação clínica do seguimento conforme anexo II.6.).

## **II.6. Estudos moleculares**

### **II.6.1. Extração de DNA a partir de sangue em papel de filtro**

A extração de DNA realizada neste estudo foi efetuada por dois métodos distintos, com base na quantidade de DNA estimada. Para amostras colhidas nos dias de *follow up*, onde se esperava uma baixa concentração da parasitémia, selecionou-se a técnica de extração de DNA por fenol – clorofórmio, devido à sua sensibilidade e pela qualidade e grau de pureza do DNA obtido. Nos clones de *P. falciparum* e nas amostras utilizados para controlos no PCR, a extração de DNA foi efetuada pelo método com Chelex, conforme protocolos descritos abaixo [63, 64, 65].

#### **II.6.1.1. Método de fenol-clorofórmio**

De cada amostra de sangue em papel de filtro foi cortado um fragmento (contendo aproximadamente 50 µl de sangue) ao qual foi adicionado 1 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Sigma 087K8213) e Saponina 0,05% v/v (Sigma 101010298) com agitação (Vortex Heidolph Reax 2000), de seguida procedeu-se a uma centrifugação (Centrifuge 5417C-Eppendorf) a 14000 rpm durante 10 min. Após uma lavagem com PBS o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao fragmento de papel 75 µl tampão de lise e Proteínase K a 2 mg/ml (Fermentas #E00491), as amostras foram incubadas por um período mínimo de 12h, a 37°C em estufa (Heraem).

A extração de DNA foi efetuada pela adição de 500 µl de fenol equilibrado (Sigma, ref. 050M1384) seguida de uma centrifugação a 14000 rpm, durante 10 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 500 µl de fenol/clorofórmio equilibrado (Sigma, ref. 108K1318) e foi centrifugada a 14000 rpm, durante 10 min. O DNA que se encontrava na fase aquosa foi recuperado para novo tubo e foi precipitado com 45 µl de acetato de sódio (Sigma-Aldrich, ref. S2889) 3 M e 1 ml de etanol absoluto (Panreac, ref. 121086.1211) durante pelo menos 12 h a -20°C. Efetuou-se a lavagem do DNA com etanol a 80%.

O DNA obtido foi seco sob ação de vácuo (Concentrator 5301-Eppendorf) à temperatura ambiente, tendo posteriormente sido eluído em 20 µl tampão de Eluição e armazenado a -20°C. No processo de extração de DNA foram incluídos, intercalados entre as amostras,



controles negativos, constituídos por papel de filtro sem amostra, mas processados da mesma forma, para descartar a possibilidade de eventuais contaminações entre os diferentes isolados [64].

#### **II.6.1.2. Método com Chelex**

Um fragmento de papel de filtro, contendo aproximadamente 50 µl de sangue, foi colocado num tubo de 1,5 ml. A hemólise foi realizada pela adição de 1ml de PBS (Sigma 087K8213) + 50 µl de Saponina (Sigma 101010298) (10% v/v) ao papel de filtro contendo a amostra sanguínea, tendo sido incubadas 4 – 16 h, a 4° C, seguindo-se uma lavagem com PBS e nova incubação a 4° C, durante 15 - 30 min.

A extração de DNA foi realizada adicionando-se 50 µl de uma solução de Chelex a 20% (Biorad), as amostras foram posteriormente incubadas a 95° C (Bloco de aquecimento Grant – Boekel BBD), durante 10 minutos. Finalmente, foram realizadas duas centrifugações (15 800 x g/ 5 min.), a primeira com o objetivo de eliminar o papel de filtro, e a segunda, para eliminar os resíduos de Chelex em suspensão na amostra de DNA [65].

#### **II.6.2. Prevalência de polimorfismos do parasita e sua associação à resposta ao Coartem®**

##### **II.6.2.1. PCR para identificação de espécies de *Plasmodium***

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) é uma técnica *in vitro* que possibilita a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima DNA-polimerase. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento, o *primer* ou iniciador, esteja ligado a uma das cadeias do DNA “molde” no ponto escolhido para o início da síntese, mesmo na presença de outras moléculas de DNA ou genes. Os *primers* definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA com bilhões de cópias.

A identificação de espécies de *Plasmodium* foi realizada através da técnica de *nested-PCR*, para confirmação do diagnóstico previamente realizado por microscopia ótica. A utilização de PCR para deteção de parasitas da malária em amostras de sangue aumenta

a sensibilidade de deteção em comparação com a microscopia, em particular em infeções mistas e/ou com parasitémias baixas.

A técnica de nested-PCR, consiste em duas reações de PCR independentes, onde o produto amplificado da primeira reação, serve de DNA molde para a segunda amplificação, aumentando assim a sua sensibilidade e especificidade. Na primeira reação foram usados *primers* específicos de género (rPLU1/rPLU5), que amplificam um fragmento de ~1.2 kb e têm como alvo o gene que codifica a menor subunidade do ácido ribonucleico ribossomal (ssrRNA) 18S. Na segunda reação foram utilizados *primers* específicos de espécie (rFAL F/R, rVIV F/R, rMAL F/R e rOVA F/R), que amplificam fragmentos de tamanhos diferentes para cada uma das espécies de *Plasmodium*. Na tabela II.2., estão descritas as sequências dos *primers* e condições de amplificação utilizados em cada reação de PCR [63].

**Tabela II.2.** – Sequências dos *primers* utilizados no PCR para identificação de espécies de *Plasmodium*, tamanho do fragmento amplificado e programa utilizado. *Primers* publicados por Singh *et al.*, 1999

Gene	Primers	Sequência	Região alvo	Condições de PCR
rPLU	Forward	5' - CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC - 3'	~ 1,2 kb	95°C, 3'
	Reverse	5' - TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG - 3'		94°C, 1' 58°C, 1' 72°C, 1'
rFAL	Forward	5' - TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT - 3'	205 pb	30 ciclos
	Reverse	5' - ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC - 3'		
rVIV	Forward	5' - CGT TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC - 3'	120 pb	55°C, 3'
	Reverse	5' - ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA - 3'		94°C, 1'
rMAL	Forward	5' - ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC - 3'	144 pb	58°C, 1'
	Reverse	5' - AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA - 3'		72°C, 1'
rOVA	Forward	5' - ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA - 3'	800 pb	35 ciclos
	Reverse	5' - GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTC - 3'		

A mistura de reação utilizada foi constituída por: 125 nM de cada *primer* (StabVida), 1X Tampão Green Go Taq® (Promega, ref. M891A), 2 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, ref. A351H), 125 µM de dNTP's (100 mM, 25 µmol, Fermentas) e 0,02 U/µl de Go Taq® DNA polymerase 5 U/µL (Promega, ref. M830B), utilizando como molde 1 µl de DNA de cada amostra. A mistura de reação foi preparada para o volume final de 20

μl, tendo o volume sido ajustado com água destilada, desmineralizada e autoclavada. As reações de PCR foram efetuadas num T1 Thermocycler – Biometric [64].

#### **II.6.2.2. Identificação de polimorfismos no gene *pfmsp2* por PCR**

Em estudos de eficácia terapêutica em malária o seguimento dos pacientes após o tratamento é fundamental, pois permite avaliar a resposta terapêutica, a deteção de infeções recrudescentes após a *clearance* de parasitas, assim como a identificação de novas infeções.

As populações de *P. falciparum* em regiões endémicas são bastante diversificadas. Muitas estirpes de *P. falciparum* apresentam uma grande variedade genética, nomeadamente nos genes *msh1*, *msh2* e *glurp* (*glutamate rich protein*), portanto devido ao seu elevado grau polimórfico estes *loci* podem ser utilizados para distinguir recrudescentes de novas infeções, uma vez que é bastante improvável que pacientes em áreas de elevada transmissão (como é o caso de Angola) sejam infetados por uma população parasitária igual à inicial durante o período de seguimento.

Está documentado o facto de que, dada a elevada diversidade do gene *pfmsp2*, a sua caracterização é suficiente para permitir a distinção entre recrudescentes e reinfeções, o que justificou a escolha deste gene neste estudo.

O *pfmsp2* apresenta duas famílias parasitárias bastante polimórficas (*IC* e *FC27*) que permitem diferenciar populações de *P. falciparum*.

Neste estudo, foi analisada a genotipagem do *pfmsp2* em todos pacientes no D0 e em todos aqueles que apresentaram parasitas, detetáveis por PCR, nos dias de seguimento. Aos pacientes com seguimento completo, que incluiu um dos dias 14, 21 ou 28 foi avaliada a diversidade de estirpes de *P. falciparum* encontradas na amostra nos dias do seguimento e comparadas com a população inicial.

A mistura de reação de PCR utilizada para a realização da genotipagem do *pfmsp2* foi semelhante à utilizada para o PCR de identificação de espécies, com a exceção da concentração de MgCl<sub>2</sub>, que foi utilizado a 1μM. A tabela II.3. mostra os *primers* utilizados e as condições de amplificação por PCR [64].

**Tabela II.3.** – Sequência dos *primers* utilizados para a genotipagem do *pfmsp2*, tamanhos dos fragmentos amplificados e condições de amplificação. *Primers* publicados por Snounou *et al.* (1999)

Gene	<i>Primers</i>	Sequência	Região alvo	Condições de PCR
<i>pfmsp 2</i>	Forward	5'- ATGAGGGTAATTAAAAACATTGTCTATTATA- 3'		95°C, 5'
	M2-O	Reverse		94°C, 1'
				58°C, 1'
				72°C, 1'
	M2-FC	Forward	250-450 pb	95°C, 5'
		Reverse		94°C, 1'
	M2-IC	Forward	400-750 pb	58°C 2'
		Reverse		72°C, 2'

### II.6.2.3. PCR-RFLP para determinação da frequência de polimorfismos em genes do *P. falciparum*

O PCR-RFLP (PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) consiste na digestão com enzimas endonucleases (enzima de restrição) de um fragmento de DNA, amplificado por PCR, portador de uma mutação, cuja endonuclease reconheça especificamente o palindroma<sup>1</sup> originado ou eliminado pela presença do polimorfismo, permitindo a identificação do alelo presente na amostra.

Para a identificação dos polimorfismos analisados, foram amplificados por PCR os fragmentos dos genes correspondentes aos fragmentos delimitados pelos *primers* descritos na Tabela II.4. As mutações, contidas em cada um dos fragmentos amplificados, foram identificadas pela digestão dos mesmos com enzimas de restrição específicas, que reconhecem as alterações genéticas em análise.

O DNA dos clones 3D7 e Dd2 foi utilizado como controlo, representando genótipos do *P. falciparum* sensível e resistente a antimaláricos, respetivamente [34].

Os *primers* descritos na tabela II.4. foram utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *pfmdr1* contendo os codões 86 e 1246 e o códon 769 do gene *pfATPase6*.

A mistura de reação utilizada para a amplificação dos fragmentos contendo os polimorfismos, tanto no codão 86, como no codão 1246, foi constituída por: 0,15 µM de cada *primer* (StabVida), 0,5 X Tampão Green Go Taq<sup>®</sup> (Promega, ref. M891A), 3,125 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, ref. A351H), 200 µM de dNTP's (100 mM, 25 µmol, Fermentas) e 0,05 U/ml de Go Taq<sup>®</sup> DNA polymerase 5 U/µl (Promega, ref. M830B); a solução utilizada para a amplificação do códon 769 do gene *PfATPase6* foi de 25 µl em 1x tampão de PCR, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mM dNTP's, 0,125 U/µl de Taq DNA polimerase, tendo sido utilizando como molde 1 µl de cada amostra. A mistura de reação foi preparada para um volume final de 20 µl/amostra, sendo o volume ajustado com água bi-destilada autoclavada.

---

<sup>1</sup> Palindroma - sequência de nucleótidos reconhecida especificamente por determinada endonuclease, que permite a restrição nesse local do DNA.

**Tabela II.4.** – *Primers* utilizados para genotipagem de *Pfmdr1*, tamanho dos fragmentos amplificados e condições de amplificação[67]

Gene		<i>Primers</i>	Tamanho do fragmento	Condições de PCR
<i>pfmdr1</i>	N86Y	<i>Forward</i>	5' - ATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG - 3'	
	1ª amplificação	<i>Reverse</i>	5' - CGTACCAATTCCTGAACTCAC - 3'	504 pb
	N86Y	<i>Forward</i>	5' - GTATGTGCTGTATTATCAGGAGGA - 3'	94°C, 3'
	2ª amplificação	<i>Reverse</i>	5' - CGTACCAATTCCTGAACTCAC - 3'	94°C, 30" 53°C, 30" 10X 68°C, 1'
	D1246Y	<i>Forward</i>	5' - CTACAGCAATCGTTGGAGAAA - 3'	94°C 30"
	1ª amplificação	<i>Reverse</i>	5' - GCTCTAGCTATAGCTATTCTC - 3'	50°C 30" 35X 68°C 1'
	D1246Y	<i>Forward</i>	5' - CTACAGCAATCGTTGGAGAAA - 3'	
	2ª amplificação	<i>Reverse</i>	5' - CTTACTAACACGTTTAACATCTTCCA - 3'	≈ 392
<i>pfATPase6 769</i>		<i>Forward</i>	5' ACT TAG CTT TAT AAA ACT TAA 3'	94°C, 3' 1x 94°C, 45"
				54°C, 45" 40 x
		<i>Reverse</i>	3' AAT TAT CCT TTT CAT CAT CTC C 5'	72°C, 45"
				72°C 15' 1 x 4°C pausa

Após amplificação dos fragmentos por PCR, foram realizadas digestões enzimáticas num volume de reação final de 20 µl com 0,2 µl de enzima, 2 µl de tampão e 10 µl do produto amplificado. A digestão enzimática dos SNP's analisados foi realizada de acordo com os protocolos facultados pelos fornecedores das enzimas. As reações foram efetuadas à temperatura de atividade ótima para cada delas, conforme apresentado na Tabela II.5.

**Tabela II.5.** – Temperaturas de incubação de cada enzima de restrição e tamanhos dos respetivos fragmentos

Gene	SNP	Mutação	Enzima restrição	Temperatura	Alelo reconhecido	Tamanho de fragmentos	
<i>Pfmdr1</i>	N86Y	754 (A/T)	<i>ApoI</i>	50°C	86N	N 249 + 72	
		<u>A</u> AT -> <u>T</u> AT					Y 321
	D1246Y	4232 (G/T)	<i>EcoRV</i>	37°C	1246Y	D 392	Y 249 + 143
		<u>G</u> AT -> <u>T</u> AT					
<i>PfATPase6</i>	S769N	S => N	<i>BspI</i>	37°C	769S	S 250 + 22	N 272
		AGT => AAT					

Legenda: N – Asparagina; D – Ácido Aspártico; Y – Tirosina; S – serina; N - Asparagina

Os produtos amplificados resultantes da digestão foram posteriormente analisados após separação por eletroforese dos fragmentos de DNA em gel de agarose a 3% (SeaKem® LEAgarose, ref. 50004).

#### II.6.2.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A elevada quantidade de produto amplificado por PCR permite a visualização do DNA em gel de agarose, após eletroforese e coloração com brometo de etídio (0,1 µg/ml), sob luz ultravioleta (UV). O gel de agarose (SeaKem® LEAgarose, ref. 50004) foi preparado numa concentração de 2% em solução tampã TBE, contendo tris, ácido bórico e EDTA 1X.

Para confirmação do peso molecular dos fragmentos obtidos foi utilizado o Marcador de Peso Molecular Gene Ruler DNA Ladder® (Fermentas, ref. #SM0331) (Fig.4). A eletroforese foi efetuada em tampão TBE 1X a 4 V/cm.

A Visualização do DNA foi realizada no equipamento UVIDOC, que permite a visualização do DNA no gel corado com brometo de etídio, sob luz UV.

#### II.6.2.5. Avaliação do número de cópias do *pfmdr1* por PCR em tempo real

O número de cópias dos genes *pfmdr1* foi determinado por PCR em tempo real, usando o cromóforo SYBR Green, que emite fluorescência quando ligado a DNA em cadeia dupla; não interferindo com muitas enzimas utilizadas em biologia molecular, nomeadamente Taq DNA polimerase [68].

Neste trabalho, foi utilizado o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para estimar o número de cópias do gene *pfmdr1*. Este método permite estimar o número de cópias de um gene em amostras desconhecidas, requerendo dois pré-requisitos principais: a) existência de pelo menos um calibrador, que corresponde a amostra com número de cópias conhecido do gene em estudo; b) existência de um gene endógeno de referência ou constitutivo (*house-keeping gene*) com número de cópias constante.

As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas em triplicado com a seguinte mistura de reação: 1X iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, ref. 170-8880), *primers* a 300 nM (tabela II.6.) e 2 µl DNA; num volume final de 20 µl. As reações de amplificação do gene alvo (*pfmdr1*) e do controlo endógeno (*pfβactina1*) foram realizadas separadamente, na mesma placa (*singleplex*). O PCR em tempo real foi realizado no aparelho iCycle IQ™ (BIO-RAD), utilizando as seguintes condições: 10 min de incubação inicial a 95° C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60° C.

Foram realizados 3 ensaios independentes e cada um deles em triplicado. No final de cada reação, o limiar de ciclo (*Threshold Cycle* -CT) foi manualmente configurado no nível que reflete os melhores parâmetros cinéticos do PCR, as curvas de fusão foram determinadas e analisadas [68].

**Tabela II.6.** – Sequência de *primers* para os genes da *pfβactina1* e *pfmdr1* e respetivo tamanho dos fragmentos para estimativa de número de cópias por PCR em tempo real [69].

Gene	Primer	Sequência	Tamanho dos fragmentos
<i>Pfβactina</i>	<i>Foward</i>	5' - CGG ATC AGG TAA TGT AAA AGC - 3'	90 pb
	<i>Reverse</i>	5'- CCT GGA TTC TTT GGT CTT CC - 3'	
<i>pfmdr1</i>	<i>Foward</i>	5' - CAA GTG AGT TCA GGA ATT GGT AC - 3'	230 pb
	<i>Reverse</i>	5' - GCC TCT TCT ATA ATG GAC ATG G - 3'	



Para análise dos dados obtidos foi utilizado o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , que permite estimar o número de cópias de *pfmdr1* por quantificação relativa, tendo como calibrador o DNA dos clones de *P. falciparum* 3D7 e Dd2, que possuem uma e quatro cópias do gene *pfmdr1*, respetivamente. Como controlo interno foi utilizado *pfb-actinaI*.

Este modelo permite determinar a variação de expressão (N) de um gene pela equação A;

$$N = 2^{-\Delta\Delta C_t} \text{ (equação A)}$$

em que;

$$\Delta\Delta C_t = (C_t, \text{ alvo} - C_t, \text{ controlo interno})_{\chi} - (C_t, \text{ alvo} - C_t, \text{ controlo interno})_{\gamma} \text{ - equação}$$

**B**

onde  $\chi$  corresponde à amostra na qual se pretende determinar a variação de expressão do gene em estudo e  $\gamma$  é a amostra calibrador em relação à qual se determina a variação de expressão do gene alvo.

Considerando que os valores utilizados no tratamento dos resultados correspondiam à média dos triplicados realizados, a precisão e a reprodutibilidade do PCR em tempo real foram avaliadas pela determinação do desvio padrão (DP), apresentado pelas 3 réplicas de cada amostra, relativamente à média dos valores de CT. O valor de 0,38 foi considerado com referencia para o desvio padrão de cada conjunto de triplicados; assim todas as amostras que apresentaram um desvio padrão superior a 0,38 foram excluídas e submetidas a nova análise.

Os resultados foram expressos em N-vezes em relação ao número de cópias de *pfmdr1* no clone de *P. falciparum* 3D7; as amostras com valor de N superior a 1,6 foram consideradas como tendo mais de uma cópia do gene *pfmdr1*.

#### **II.6.2.6. Determinação de polimorfismos no *pfK13* por sequenciação**

O estudo dos polimorfismos (SNP's), nos fragmentos específicos do gene *pfK13-Propeller*, foi efetuado por sequenciação [34]. O fragmento pretendido foi amplificado por PCR e posteriormente sequenciado no laboratório genómico da empresa Stabvida-Lisboa.

A identificação da sequência de cada amostra em estudo permitiu a identificação dos polimorfismos nos codões: 449(*G>A*), 458(*N>Y*), 474(*T>I*), 481(*A>V*), 493(*Y>H*), 508(*T>N*), 533(*G>S*), 537(*N>I*), 539(*R>T*), 1543(*I>T*), P553(*P>L*), 561(*R>H*), 568(*V>G*), 574(*P>L*), 580(*C>Y*) e 584(*D>V*).

As sequências foram analisadas com o software Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) para identificação de eventuais mutações ou SNP's por comparação entre as sequências das amostras e as previamente descritas noutros estudos.

#### **II.6.2.7. Polimorfismos em genes do hospedeiro humano, envolvidos no transporte e metabolização de fármacos**

Foi utilizado o DNA total das amostras colhidas para a avaliação da eficiência do antimalárico coartem® e estudos moleculares do *P. falciparum* acima mencionados. A amplificação dos fragmentos contendo os SNP's nos genes CYPs e MDR1 e a análise genotípica dos mesmos foram efetuadas por PCR e PCR-RFLP. Os primers e as enzimas utilizados para os diferentes SNP's foram adquiridos à StabVida, Lda e Thermo Fisher Scientific, respetivamente e encontram-se apresentados na tabela II.17.

Após otimização a mistura de reação de PCR utilizada foi constituída por: 5X Tampão Green Go Taq® (Promega, ref. M891A), 25 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, ref. A351H), 5 mM de dNTP's (100 mM, 25 µmol, Fermentas), 5 U/µl de Go Taq® DNA polymerase 5 U/µl (Promega, ref. M830B) e os *primers* específicos em concentrações determinadas pelos fornecedores. De forma geral, a mistura de reação foi preparada para um volume final de 20 µl, tendo o volume sido ajustado com água destilada, desmineralizada e autoclavada. As reações foram efetuadas num T1 Thermocycler – Biometric.

Os *primers* utilizados para genotipagem dos SNP's em análise, as condições de amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos amplificados estão mencionados na tabela II.17. Na tabela II.18, estão descritas as condições e enzimas de restrição utilizadas no PCR-RFLP, bem como o tamanho de fragmentos resultantes da restrição.

**Tabela II.17.** - Primes utilizados para genotipagem dos SNP's, condições de amplificação por PCR e tamanho de fragmentos.

<i>Gene</i>	<i>SNP</i>	Primers F/R – 5' – 3'	Frag (bp)	Condições de amplificação		
<i>MDR1</i>	<i>T129C</i>	TCT CGA GGA ATCAGC ATT CAG TCA ATC C CTA AAG GAA ACG AAG AGC GGC CTC TG	197		94°C, 3'	92°C, 30"
	<i>C3435T</i>	ATG GGC TCC GAG CAC ACC TG AGG CAG TGA CTC GAT GAA GGC	140		60/63°C, 45" 40X	72°C, 45'
<i>CYP11A1</i>	<i>A2455C</i>	CGG TTT CTC ACC CCT GAT GGT GCA A CTC AAG CAC CTA AGA GCG CA	204	Buffer: 1 X' MgCl2: 1,5 mM' dNTP: 0,2mM Primer-F/R: 0,2nM Taq: 0,05U/μl DNA: 1 μl	94°C, 2'	92°C, 45" 59°C, 45" 40X 72°C, 45''
	<i>C4326G</i>	GTC AAC CAG TGG TCT GTG AAT CAT GA CTG CAT CTT AGA AAG TTC TTC GCCA	146	Buffer: 1 X' MgCl2: 2mM' dNTP: 0,2mM Primer-F/R: 0,2nM Taq: 0, 125U/μl DNA: 1 μl	94°C, 3'	92°C, 30" 53°C, 45" 40X 72°C, 45'
<i>CYP11B1</i>	<i>C4360G</i>	ACC TGC CCT ATG TCC TGG CCT TCC T CTG CAT CTT AGA AAG TTC TTC GCC A	308		72°C, 45"	4°C Pausa
	<i>C792G</i>	ATG TTG CTC TTA CAC GAA GTT ACA ATC TTA CCT GCT CCA TTT TGA	167	Buffer: 1 X' MgCl2: 1,5 mM' dNTP: 0,4 mM Primer-F/R: 0,2 nM Taq: 0, 05 U/μl DNA: 1 μl	94°C, 3'	94°C, 45" 54/55°C, 45" 40X 72°C, 45''
<i>CYP2C8</i>	<i>A1196G</i>	CTT CCG TGC TAC ATG ATG ACG CTG CTG AGA AAG GCA TGA AG	117		72°C, 45'	4°C Pausa
	<i>A805T</i>	ATG TTG CTC TTA CAC GAA GTT ACA ATC TTA CCT GCT CCA TTT TGA	312			
<i>CYP3A4</i>	<i>A392G</i>	AAT GAG GAC AGC CAT AGA GAC AAG GCC CAA TCA ATG TTA CTG GGG AGT CCA AGG G	210	Buffer: 1 X' MgCl2: 1,5 mM' dNTP: 0,2 mM Primer-F/R: 0,2 nM Taq: 0,124 U/μl DNA: 1 μl	94°C, 3'	92°C, 45"
	<i>T673C</i>	AGA TTT GAT TTT TTG GAT CCA TTC TTT GTC CAA ATC ACT GAA CTG TAT ATT TTA AGT GG	151		52/61°C, 45" 40X	
<i>CYP3A5</i>	<i>A6986G</i>	TGA GCA CTT GAT GAT TTA CC GGT CCA AAC AGG GAA GAG GT	214	Buffer: 1 X' MgCl2: 2 mM' dNTP: 0,2 mM Primer-F/R: 0,5 nM Taq: 0,05 U/μl DNA: 1 μl	72°C, 45''	72°C, 2'
					4°C Pausa	

Legenda: Frag = fragmento; bp = par de bases

**Tabela II.18.** - Enzima de restrição para PCR-RFLP, temperatura de incubação, alelo identificado e tamanho de fragmentos

Gene	SNP	Enz restrição	Temp. °C	Alelo	Tamanho de fragmento	
					Wt	Bp Mutante
<i>MDR1</i>	<i>T129C</i>	MspA1 I	37	<i>129C</i>	197	148 + 49
	<i>C3435T</i>	Sau3A I	37	<i>3435C</i>	112 + 28	140
<i>CYP1A1</i>	<i>2455A&gt;C</i>	BseNI	55	<i>2455C</i>	204	149 + 55 *1B
	<i>4326C&gt;G</i>	Bse NI	55	<i>4326G</i>	146	99 + 47
<i>CYP1B1</i>	<i>4360C&gt;G</i>	Alu I	37	<i>4360C</i>	149 + 110 + 49	308
	<i>CYP2C8</i>	Bcl I	65		214 + 98	312
	<i>A805T</i>			<i>805<sup>A</sup></i>		*2
		XmnI	37		92 + 25	117
	<i>A1196G</i>			<i>1196<sup>A</sup></i>		*3
		Taq I	65		83+53+31	136 + 31
	<i>C792G</i>			<i>4360<sup>A</sup></i>		*4
	<i>CPT3A4</i>	Bst NI	37		<i>175+169</i>	<i>158+31+12+10</i>
	<i>A392G</i>			<i>392G</i>		*1B
	<i>T673C</i>	Alw26 I	37	<i>673T</i>	<i>123 + 28</i>	<i>151</i>
<i>CYP3A5</i>	<i>A6986G</i>	Rsa I	37	<i>6986A&gt;G</i>	<i>120 + 94</i>	<i>120+74+20</i>

Legenda: Enz = enzima; pb = par de bases; Temp = temperatura

*CYP1B1*\*3 = *CYP1B1*4326G (*Leu*432*Val*); *CYP1B1*\*5 = *CYP1B1*4360G (*Ala*443*Gly*)

Posteriormente, os produtos da amplificação por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3 % em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 120 V/cm durante 1 h; o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5 µl/ml de Brometo de Etídeo, por aproximadamente 15 min e as imagens foram visualizadas no UVIDOC [63].

### II.6.3. Doseamento de antimaláricos (AL) por HPLC

As amostras foram colhidas de pacientes com malária por *P. falciparum* não complicada, nos dias 0 (D0), D3 e D7. Consistiram em duas gotas de sangue (cerca de 100 µl) colhidas por punção digital em papel de filtro Whatman® nº 41 previamente tratado com ácido

tartárico 0,75M; a seguir, o papel de filtro foi seco à temperatura ambiente, por três horas, e acondicionado em envelope devidamente identificado.

Em virtude do IHMT não reunir condições para a realização deste tipo de análise (HPLC), foi estabelecida colaboração com o Departamento de Química Analítica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, para a realização desta avaliação.

#### **II.6.3.1. Extração da lumefantrina das amostras de sangue total em papel de filtro**

As amostras em papel filtro (com cerca de 100 µl de sangue cada um) foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para tubos de centrífuga de polipropileno de 15 ml, aos quais foram adicionados 2mL de ácido acético a 30%. Posteriormente, foram homogeneizados por 15 minutos e transferidos para ultra-som por uma hora, tendo-se seguido uma centrifugação a 2000 rpm por 10min. O papel de filtro foi retirado, com auxílio de um palito de madeira e adicionados 56,60 µl do PI (212 µg/ml) e 6 ml de hexano-éter etílico (7:3). Os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos, homogeneizados durante 20 minutos e posteriormente centrifugados a 2500 rpm, 10 min. A fase orgânica (sobrenadante) foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno e evaporada a temperatura ambiente. O resíduo foi diluído em 100 µl da fase móvel, agitado em vórtex 30 segundos, sendo 50 µl da amostra injetada no cromatógrafo [70] .

##### **II.6.3.1.1. – Validade analítica dos métodos**

As amostras foram preparadas para a análise por HPLC, respeitando os parâmetros da validação das metodologias analíticas, segundo os critérios propostos pelo FDA, “Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation”, (2001), e resolução da ANVISA nº 899, de 29/5/2003; foram consideradas os seguintes parâmetros para avaliação: seletividade, linearidade, curva de calibração, limites de deteção e quantificação, recuperação, precisão intra e inter ensaio, estabilidade e robustez [71]. As definições dos parâmetros mencionados constam no anexo II.7.

#### **II.6.3.1.2. Otimização das condições cromatográficas**

A cromatografia foi realizada num Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Varian®, composto por uma bomba isocrática, modelo ProStar 300, um injetor manual, reodyne, com loop de 20µL, detetor de duplo canal ultravioleta e visível, ProStar, modelo 220. A separação cromatográfica foi realizada a temperatura ambiente, tendo sido utilizada uma coluna X-TERRA RP18 5µm 4.6 X 150mm [71].

As condições cromatográficas foram obtidas utilizando-se soluções padrões de artemeter (ART) CAYM11815-1 (VWR); Lumefantrina (LUM), USPH1370746 (VWR) e Padrão interno, Halofantrina (IS), H9414-50MG (Sigma-Aldrich). Foram otimizados o fluxo, a composição e pH (ajustado com ácido fosfórico 30%) da fase móvel e o comprimento de onda de deteção em acordo com o protocolo em uso no laboratório (listagem de reagentes em anexo II.8.).

### **III. Resultados**

### III.1. Eficiência terapêutica da combinação artemeter-lumefantrina

#### III.1.1. Pacientes incluídos

Durante o período de colheita de amostras verificou-se, nos laboratórios das três unidades sanitárias envolvidas, o registo de 3628 pacientes (adultos e crianças) com pedido de gota espessa para pesquisa de *Plasmodium*. Destes, apenas 972 (26,8%) apresentaram um diagnóstico, por microscopia ótica (MO), positivo para malária. Este resultado demonstra a necessidade de ter em consideração o diagnóstico diferencial de síndrome febril, mesmo em regiões endémicas da malária.

Inicialmente, foram selecionados 122 pacientes por cumprirem os critérios de inclusão definidos pelo protocolo da OMS para este tipo de estudos. Durante o seguimento foram excluídos dezanove pacientes, dos quais dois apresentaram vômitos persistentes, nove foram perdidos durante o período de seguimento e oito tiveram resultados negativos no PCR de confirmação da presença do parasita no D0. Assim, um total de 103 pacientes preencheram os critérios requeridos e concluíram o estudo; vinte e um destes (20,4%) eram crianças com idades  $\leq 5$  anos. Na generalidade o tratamento foi bem tolerado, não tendo sido reportado por nenhum paciente incluído, queixas relevantes, sugestivas de efeitos adversos associados ao antimalárico administrado.

Dos 103 pacientes elegíveis, 37 foram incluídos em 2011, 33 em 2012, e os restantes 33 em 2013. A amostra populacional foi constituída por pacientes com idades compreendidas entre 6 meses e os 56 anos de idade.

Nos dias de seguimento definidos no protocolo, foi efetuada pesquisa microscópica de *Plasmodium*, e colhidas 716 amostras em papel filtro para estudos moleculares. O grupo de crianças de até 5 anos de idade (21 crianças) representou 16% das amostras colhidas em papel filtro (n=114). A tabela III.1 apresenta a distribuição dos pacientes por dias de seguimento, e os resultados da pesquisa de *P. falciparum* por MO e PCR.

#### III.1.2. Detecção do *P. falciparum* por MO

Dos 103 pacientes submetidos ao seguimento, no D3 (um dia após o termino do tratamento com Coartem<sup>®</sup>) 11,6% (n=12) dos pacientes apresentavam parasitas detetáveis



por microscopia; em seis desses pacientes (5,8%) ainda existiam parasitas detetável por microscopia no D7 (5 dias após o fim da medicação). Entre os 96 pacientes com parasitemia negativa no D7, três voltaram a apresentar parasitemia detetável por microscopia (recorrência); um deles foi detetado no D14, tendo os outros dois sido detetados no D28 (tabela III.1). Os casos com exame microscópico positivo por formas assexuadas de *Plasmodium* a partir do D7, são classificados como falência terapêutica tardia, de acordo com o protocolo da OMS para estudos de eficácia de antimaláricos.

### **III.1.3. Detecção do *Plasmodium falciparum* por PCR**

Com o uso do método de PCR, dos 103 pacientes incluídos no estudo, 47% (n=48) apresentavam resultados positivos para *P. falciparum* no D3 e 33% (n=34) no D7; foram também detetadas amostras positivas por PCR em 19 dos pacientes no D14, em 8 no D21 e em 2 pacientes no D28 (tabela III.1).

### **III.1.4. Detecção de gametócitos**

Em 16 pacientes (15,5%), foram detetados gametócitos no D0; sete dos quais (6,8%) apresentavam ainda gametócitos no D7. Esta forma sexuada foi também encontrada nos D14, D21 e D28 em três, um e um paciente, respetivamente.

**Tabela III.1.** Distribuição dos resultados por MO e PCR nos dias de seguimento

<i>Follow up</i>	D0	D1	D2	D3	D7	D14	D21	D28
2011								
n	37	37	37	36	36	35	35	35
MO (+)	37 (100)	25 (67.5)	8 (21.6)	3 (8,3)	1 (2.8)	0	0	1 (2.8)
PCR (+)	37	34 (92)	20 (54)	15 (41,6)	8 (22)	5 (14)	2 (5,7)	1 (2.8)
2012								
n.	33 (100)	33	33	33	33	32	31	31
MO (+)	33	27 (82)	6 (18)	4 (12)	2 (6)	1 (3)	0	0
PCR (+)	33	30 (91)	19 (58)	14 (42)	10 (30)	3 (9)	1 (3,2)	0
013								
n.	33	33	33	33	33	29	29	29
MO (+)	33 (100)	30 (91)	6 (18)	5 (15)	3 (9)	0	0	1 (3.4)
PCR (+)	33	33 (100)	30 (91)	19 (57,6)	17 (51.5)	11 (37)	5 (17)	1 (10)
Total								
n.	103	103	103	102	102	96	95	95
MO (+)	103 (100)	82 (80)	20 (19)	12 (11,6)	6 (6)	1 (1)	0	2 (2)
PCR (+)	103	97 (94)	69 (67)	48 (47)	35 (34)	19 (20)	8 (8,4)	2 (4)

Legenda: n = Número de pacientes observados; MO (+) = amostra positiva para *P. falciparum* por MO; PCR (+) = amostra positiva para *P. falciparum* por PCR.

### **III.1.5. Evolução do quadro febril**

Em média, o tempo da melhoria do quadro febril foi de aproximadamente 24 h, após a dose inicial do AL (D0); no D1 (segundo dia de tratamento) 97% (n=100/103) dos pacientes não apresentavam febre. Um paciente apresentou um quadro febril persistente e parasitemia no D2. A partir do D3 a totalidade dos pacientes encontrava-se afebril.

Durante o período de acompanhamento clínico, os pacientes que tinham parasitemia detetável por microscopia no D3, D7 e D14 não apresentando qualquer sinal clínico de malária; em dois pacientes com parasitemia detetável no D28, um tinha quadro clínico sugestivo de malária.

### **III.1.6. Classificação da resposta terapêutica**

Dos 103 pacientes analisados, 90,3% (IC 95%: 82,4 – 95,1; n=93/103) tiveram resposta clínica e parasitológica adequada (RCPA), ou seja, não apresentaram qualquer critério de falência terapêutica precoce ou tardia, sendo 9,7% dos incluídos (IC 95%: 4,9 – 17,7; n=10/103) tiveram algum critério de falência terapêutica (precoce ou tardia) durante o período de seguimento de 28 dias.

Um paciente, pertencente ao grupo da faixa etária de  $\leq 5$  anos apresentou quadro febril persistente e parasitemia no D2, tendo sido classificado como falência terapêutica precoce (FTP); anove dos pacientes incluídos foi atribuída a classificação de falência terapêutica tardia (FTT), por apresentarem critérios de falência terapêutica após o D3 de seguimento. Dos FTT, oito foram classificados como falência parasitológica tardia (FPT) por serem assintomáticos, no entanto com parasitas detetáveis por microscopia, tendo seis deles parasitemia persistente no D7, o que originou o termino do estudo com classificação de falência terapêutica tardia, um paciente apresentou reaparecimento da parasitemia no D14 e outros dois no D28. Um dos pacientes com reaparecimento da parasitemia no D28 apresentou quadro febril, tendo sido classificado como falência clínica e parasitológica tardia (FCPT).

Após a correção dos resultados por PCR, a taxa global de cura foi de 91,3% (IC 95%: 83,6 – 95,8; n = 94/103), sendo a falência terapêutica de 8,7% (IC 95%: 4,2 – 16,4; n=9/103), em virtude de um paciente classificado como falência terapêutica ter

apresentado critérios de reinfeção. Das 21 crianças do grupo etário  $\leq 5$  anos incluídas no estudo, cinco (23,8%) apresentaram falência terapêutica.

Em comparação, a taxa de cura foi de 95% (88,7 – 98,4;  $n = 78/82$ ) no grupo etário de  $>5$  anos e de 76% (66,4 – 84,0;  $n = 16/21$ ) nos pacientes do grupo  $\leq 5$  anos; não foi observado uma associação estatisticamente significativa entre os resultados terapêuticos obtidos nos dois grupos etários em análise ( $X^2 = 0,9229$ ,  $df = 1$ ;  $P = 0,335$ ).

**Tabela III.2-** Resposta terapêutica após tratamento com AL

Ano	Classificação	N	%	IC = 95%
2011	RCPA	34	91,9	84,8 – 96,5
	Falência	3	8,1	3,5 – 15,2
	Total	37	100	
2012	RCPA	31	93,9	87,4 – 97,8
	Falência	2	6,1	2,2 – 12,6
	Total	33	100	
2013	RCPA	28	84,8	76,5 – 91,3
	Falência	5	15,2	8,7 – 23,5
	Total	33	100	
Total	RCPA	94	91,3	83,6 – 95,8
	Falência	9	8,7	4,2 – 16,4
	Total	103	100	

Legenda: FCPT - falência clínica e parasitológica tardia; FTP - falência terapêutica precoce; FPT - falência parasitológica tardia; RCPA - resposta clínica e parasitológica adequada.

### III.2. Análise de polimorfismos em genes de *P. falciparum*

#### III.2.1. Genotipagem do *pfmsp2*

A genotipagem do *pfmsp2* foi analisada por PCR-RFPL em noventa e seis amostras amplificaram com êxito para o D0. Das amostras analisadas 61% ( $n = 59$ ) eram portadoras

de apenas uma única famílias alélicas do *pfmsp2* (FC27 ou 3D7/IC), enquanto 38,5% (n = 37/96) continham ambas as famílias (FC27 + 3D7/IC).

A família 3D7/IC foi a predominante, representando 68,7% (n = 66) das amostras no D0 e ao longo do período de seguimento; em 36,4% (n = 35) das amostras foram observadas bandas com padrões heterogêneos (independentemente da família alélica), sugerindo infecção policlonal inicial (D0). A partir de D7, não se observaram amostras contendo ambas as famílias, ou seja, infecção mista (tabela III.3).

**Tabela III.3.** Distribuição dos genótipos do *pfmsp2* durante o período de seguimento

Família alélica	D0	D3	D7	D14	D28
3D7/IC	43	17	11	1	1
FC27	26	15	7	3	1
Misto	27	2	0	0	0
Total	96	33	18	4	2

### III.2.2. Marcadores moleculares de resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos

Determinados polimorfismos, nomeadamente mutações pontuais (SNP's) em genes do *P. falciparum* têm sido associadas com a modulação da suscetibilidade do parasita aos antimaláricos, este fenómeno tem sido demonstrado em estudos *in vitro* e em isolados clínicos.

Neste trabalho, foram analisados SNP's nos genes *pfmdr1*, *pfatp6* e *pfK13-propeller*, bem com o aumento de número de cópias do gene *pfmdr1*, com o objetivo de observar as frequências dos mesmos na amostra populacional em estudo e a sua associação com a resposta terapêutica à combinação utilizada (AL).

#### III.2.2.1. SNP's N86Y e D1246Y do gene *pfmdr1*

Foram analisados os SNP's N86Y e D1246Y do gene *pfmdr1* em 94 e 96 amostras, respetivamente, que amplificaram com êxito por PCR-RFLP no D0.

Relativamente ao polimorfismo *N86Y*, das 94 amostras analisadas, 28 foram colhidas em 2011, 33 em 2012 e 33 em 2013; tendo sido analisado o SNP *D1246* em 31, 33 e 32 amostras colhidas nos respetivos anos mencionados (ver tabela III.4).

As frequências genotípicas globais para o codão *86N>Y*, analisadas no D0, foram as seguintes: 73,4% (CI 95%: 66,0 – 83,0; n=69/94) para o genótipo selvagem (*86N*), 18,1% (CI 95%: 10,6 – 27,7; n=17/94) com infeções mistas (*N+Y*) e 8,5% (CI 95%: 2,1 – 15,8; n=8/94) para o alelo mutante (*86Y*).

A distribuição das frequências, por anos de colheita, está ilustrada na tabela III.4; não foi observada uma associação estatisticamente significativa entre as frequências encontradas e os anos correspondentes à colheita das amostras ( $X^2 = 2,658$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0,617$ ).

Em relação ao SNP *D1246Y*, o alelo selvagem *D1246* foi predominante (99%, n=95/96), sendo a mutação *1246Y* encontrada em apenas uma amostra (1%, n=1/96), colhida em 2012.

### III.2.2.2. Amplificação do gene *pfmdr1*

O número de cópias do gene *pfmdr1*, nas amostras colhidas no D0, foi avaliado em noventa e três amostras que amplificaram com êxito por PCR em tempo real (RT-PCR). A maioria das amostras 88,2% (IC 95%: 79,9 – 93,6; n=82/93) apresentou uma única cópia do gene *pfmdr1*; tendo o aumento do número de cópias sido observado em 11 isolados correspondente a 11,8% (IC 95%: 6,3 - 20,0), das quais 10 (10,7%) apresentavam duas cópias e, uma delas (1,1%) possuía três cópias do referido gene.

A distribuição das amostras com número de cópias do *pfmdr1* aumentado por ano de colheita foi: 9,4% (n = 3/32) em 2011; 10,3% (n = 3/29) em 2012; 15,6% (n = 5/32) em 2013; este parâmetro não apresentou uma associação estatisticamente significativa ( $X^2 = 1,615$ ,  $P = 0,446$ ).

### III.2.2.3. Polimorfismo *S769N* no gene *pfATP6*

A frequência dos genótipos do SNP *S769N* do gene *pfATP6* foi analisada em 103 amostras. A totalidade das amostras era portadora do alelo selvagem *pfATP6 769S*.

**III.2.2.4. Polimorfismos no gene *pfK13*-propeller**

Relativamente aos polimorfismos no gene *pfK13* foram analisadas 21 amostras para os *Loci* 493 (*Y>H*), 539 (*R>T*), 543 (*I>T*) e 580 (*C>Y*). O alelo selvagem foi encontrado em todas as posições (100%, n = 21/21). Na tabela III.4. encontram-se apresentadas frequências dos SNP's acima citados.

**Tabela III.4.** Frequências genotípicas de marcadores analisados.

Gene	SNP	n.	Frequências genotípicas n (%)			Frequências aalélicas % (IC 95%)	
			Wt	Mut	Misto	Wt	Mut
2011							
<i>pfmdr1</i>	<i>N86Y</i>	28	19 (68,5)	6 (21)	3 (11, 5)	73,5(64,0-82,0)	26,5 (18.8-36,0)
<i>pfatp6</i>	<i>D1246Y</i>	31	31 (100)	0	0	100	0
	> <i>Cópia</i>	32		3 (9,4)			
	<i>S769N</i>	37	37 (100)	0	0	100	0
	<i>Y493H</i>	5	5 (100)	0	0	100	0
	<i>R539T</i>	5	5 (100)	0	0	100	0
	<i>I543T</i>	5	5 (100)	0	0	100	0
	<i>C580Y</i>	5	5 (100)	0	0	100	0
2012							
<i>pfmdr1</i>	<i>N86Y</i>	33	23 (69,7)	6 (18,2)	4 (12,1)	76 (66,4-84,4)	24,0 (11,6-33,6)
	<i>D1246Y</i>	33	32 (97)	1 (3,0)	0	98,5	1,5
	> <i>Cópia</i>	29		3 (10,3)			
<i>pfatp6</i>	<i>S769N</i>	33	33 (100)	0	0	100	0
	<i>Y493H</i>	7	7 (100)	0	0	100	0
<i>pfK13</i>	<i>R539T</i>	7	7 (100)	0	0	100	0
	<i>I543T</i>	7	7 (100)	0	0	100	0
	<i>C580Y</i>	7	7 (100)	0	0	100	0
2013							
<i>pfmdr1</i>	<i>N86Y</i>	33	27 (82,0)	5 (15,1)	1(3,0)	83,4	16,6
	<i>D1246Y</i>	32	32 (100)	100	0	100	0
	> <i>Cópia</i>	32		5 (15,6)			
<i>pfatp6</i>	<i>S769N</i>	33	33 (100)	0	0	100	0
	<i>Y493H</i>	9	9 (100)	0	0	100	0
	<i>R539T</i>	9	9 (100)	0	0	100	0
<i>pfK13</i>	<i>I543T</i>	9	9 (100)	0	0	100	0
	<i>C580Y</i>	9	9 (100)	0	0	100	0
Total							
<i>pfmdr1</i>	<i>N86Y</i>	94	69 (73,4)	17 ( <b>18,1</b> )	8 (8,5)	77,7 (69 – 86)	22,3 (14 – 31)
	<i>D1246Y</i>	96	95 (99)	1 (1)	0	99,5	0,5
	> <i>Cópia</i>	93		11 ( <b>11,8</b> )			
<i>pfatp6</i>	<i>S769N</i>	103	103 (100)	0	0	100	0
	<i>Y493H</i>	21	21 (100)	0	0	100	0
	<i>R539T</i>	21	21 (100)	0	0	100	0
<i>pfK13</i>	<i>I543T</i>	21	21 (100)	0	0	100	0
	<i>C580Y</i>	21	21 (100)	0	0	100	0

Legenda: mut = alelo mutante; n = número; wt = alelo selvagem



### III.3. Análise de polimorfismos em genes do hospedeiro humano

#### III.3.1. Genes *CYP1A1* e *CYP1B1*

Os SNP's *CYP1A1*-2455A>C, *CYP1B1*-4326C>G e *CYP1B1*-4360C>G foram analisados em 100, 103 e 96 amostras, respetivamente.

Para o SNP *CYP1A1*-2455A>C, as frequências genótípicas encontradas foram de 97% (IC95%: 93,0 – 100) para o wt (2455AA); 3% (IC95%: 0,0 - 7,0; n=3/100) para o genótipo heterozigótico (2455AC / *CYP1A1*\*1/\*2B), não tendo sido encontrado o genótipo homozigótico (2455CC), que representa a variante *CYP1A1*\*2B.

O SNP *CYP1B1* 4326C>G apresentou frequências de 68% (IC95%: 60,3 – 75,2; 70/103) para o wt (4326CC); 14,6% (IC95%: 8,3 – 20,3; n=15/103) para o genótipo heterozigótico (4326CG) e 17,4 (IC95%: 9,3 – 26,6; n=18/103) para o mutante homozigótico (4326GG), que representa a variante *CYP1B1*\*3.

Enquanto a mutação no *locus* 4360C>G do gene *CYP1B1* apresentou frequências de 90,8% (IC95%: 85,7 -96,4; 89/98) e 9,2% (IC95%: 3,6 – 14,3; n=9/98) para o wt (4360CC) e o genótipo heterozigótico (4360CG) respetivamente, não tendo sido encontrado o genótipo mutante heterozigótico (4360GG), que representa a variante *CYP1B1*\*5

#### III.3.2. Gene *CYP2C8*

SNP's no gene *CYP2C8* foram analisados nas posições 792C>G, 1196A>G e 805A>T, em 100, 102 e 96 amostras, respetivamente.

Para o SNP *CYP2C8*-792C>G, o wt (792CC) foi observado em 98% (IC95%: 95,0 – 100; n=98/100) das amostras, o heterozigótico (792CG) em 2% (IC95%: 0,0 – 5,0; n=2/100); o alelo mutante (792-G), que representa a variante (*CYP2C8*\*4), não foi encontrado neste *locus*.

Na posição 1196A>G, o wt foi observado em 99% (IC95%: 96,1 - 100; n=100/101) das amostras e o genótipo misto (*CYP2C8*\*1/\*3) encontrado com a frequência de 1%

(IC95%: 0,0 – 3,9; n=1/101); não tendo sido observado o genótipo mutante homozigótico *1196GG* (correspondente à variante *CYP2C8\*3*).

O polimorfismo *CYP2C8-805A>T* apresentou as frequências genotípicas de 67,7% (IC95%: 58,3 – 77,1; n=65/96) para o wt (*805AA*); 28,1% (IC95%: 18,8 – 36,5; n=27/96) para o genótipo heterozigótico (*805AT*) e 4,2% (IC95%: 1,0 – 9,4; n=4/96) para o mutante homozigótico *805TT*, que representa a variante (*CYP2C8\*2*) (tabela III.5.).

### III.3.3. Genes *CYP3A4*

Foram analisados os SNP's, nas posições 392(*A>G*) e 673(*T>C*) do gene *CYP3A4* em 98 e 103 amostras, respetivamente, e no SNP 6986(*A>G*) do gene *CYP3A5* em 84 amostras, que amplificaram com êxito por PCR-RFLP no D0.

Nos 98 pacientes analisados para o SNP *CYP3A4 392A > G*, a frequência do genótipo encontrada nesta amostra populacional foi de 11,2% (IC 95%: 0.060 – 0.196, 11/98) para o tipo selvagem (392AA), 54,1% (IC95%: 43,8 – 64,1, 53/98) do alelo mutante homozigotico (392GG), que representa a variante alélica *CYP3A4\*1B* e 34,7% (IC 95%: 25,7 – 45,2, 34/98) para o genótipo heterozigótico (g.-392AG).

No D3, o alelo mutante *CYP3A4\*1B* foi encontrado com uma frequência de 64,6% (n=31/48) no grupo de pacientes que apresentaram PCR positivo e 40,8% (n=20/49) no grupo com PCR negativo ( $\chi^2 = 3,322$  DF = 1, p = 0, 0683) (tabela III.5.).

O genótipo *CYP3A4\*1B* foi detetado em 53,6% (n=15/28) no grupo de pacientes que tiveram parasitemia recorrente por PCR, durante o período de seguimento de 28 dias, comparado com 36,6% (n=26/71) no grupo sem parasitemia recorrente ( $\chi^2 = 2,190$ , DF = 1, p = 0,138) (tabela III.5.).

Para o locus *CYP3A4-673T>C*, a totalidade da amostras analisadas (n=103) apresentou o genótipo selvagem, não tendo sido encontrado o alelo mutante *CYP3A4-C*, que representa a variante *CYP3A4\*2*.

### III.3.4. Genes *CYP3A5*

O SNP 6986A>G no gene *CYP3A5* foi analisado com sucesso em 84 amostras, tendo sido encontradas as seguintes frequências genotípicas: 76,1% (IC95%: 66,4 – 83,9; 64/84) para o genótipo wt (6986AA), 19% (IC 95%: 11,9 -27,9; 16/84) para o heterozigótico (6986AG) e 4,8% (IC95%:0,7 – 9,5; 4/84) para o genótipo *CYP3A5* 6986-GG que representa a variante alélica *CYP3A5*\*3.

No D3, 0 *CYP3A5*\*3 (6986-GG), foi encontrado com a frequência de 2,3% (n=1/44) no grupo de pacientes com PCR positivo e 7,7% (n=3/39) no grupo com PCR negativo ( $\chi^2 = 2,335$  DF = 1, p = 0,126) (tabela III.5.). Esta forma alélica (*CYP3A5*\*3) foi detetada, por PCR, em 8% (n=2/25) no grupo de pacientes com parasitemia recorrente durante o período de seguimento de 28 dias, comparado com 3,4% (n=2/59) no grupo sem parasitemia recorrente ( $\chi^2 = 1,342$ , DF = 1, p = 0,246) (tabela III.5.).

### III.3.5. Gene *MDR1/ABCB1*

No gene *MDR1/ABCB1*, foram analisados SNP's no loci 129(T>C) e 3435(C>T) em 101 e 99 amostras respetivamente, que amplificaram com êxito no D0; em relação ao SNP *ABCB1*-3435(C>T), dos 101 pacientes analisados, as frequências de genótipo foram de 76,3% (IC95%: 66,7 – 84,1, 77/101) para o tipo selvagem (3435CC), 7,9% (IC95%: 3,5 – 15,1, 8/101) para o genotipo mutante homozigotico (3435TT) e 15,8% IC95%: (9,3 – 24,4, 16/101) para o heterozigotico (3435CT).

Em 98 amostras analisadas, o genotipo mutante *MDR1* 3435CTT foi encontrado com a frequência de 8,5% (n=4/47) no grupo de pacientes com PCR positivo no D3 e 5,9% (n=3/51) no grupo com PCR negativo ( $\chi^2 = 0,058$  DF = 1, p = 0,810) (tabela III.5.).

No entanto, durante o período de seguimento, o genotipo selvagem apresentou maior frequência no grupo de pacientes sem parasitemia recorrente 78% (60/77), em comparação com o grupo de pacientes com parasitemia recorrente, detetada por PCR (22%, 17/77) ( $\chi^2 = 20,517$  DF = 1, p = 0,0001) (tabela III.5.), verificando-se uma associação estatisticamente significativa.

O SPN *-129T>C* do gene *MDR1/ABCB1* apresentou as frequências genotípicas de 79,8% (IC95%: 70,7 - 87,9; n=79/99) para o wt (*MDR1-129TT*); 1% (IC95%: 0,0 – 4,0; n=1/99) para o mutante homozigótico (*MDR1-129CC*) e 19,2% (IC95%: 11,2- 28,3; n=19/99) para o heterozigótico.

Em relação à resposta ao tratamento com AL, não se verificou uma associação significativa relativamente ao SNP *ABCB1--129T>C* no D3 ( $\chi^2 = 5,529$ , DF = 2, p = 0.070); também não foi observada uma associação estatística entre esta posição do gene e a recorrência de parasitemia durante o período de seguimento de 28 dias, considerando que a frequência genotípica do wt foi de 88,9% no grupo de pacientes que apresentou parasitemia recorrente e 76,3% no grupo sem recorrência ( $\chi^2 = 0,415$ , DF = 1, p = 0,519) (tabela III.5.).

**Tabela III.5.** Frequências genotípicas e alélicas dos SNP's analisados.

Gene	SNP	Frequência genotípica N (%; IC=95%)		Frequência alélica % (IC=95%)	
<b>MDR1</b>	3435C>T n = 101	CC	77 ( <b>76,3</b> ; 66,7, – 84,1)	C	<b>84,2</b> (75,6 – 90,7)
		CT	16 ( <b>15,8</b> ; 9,3 – 24,4 )		
		TT	8 ( <b>7,9</b> ; 3,5 – 15,1)	T	<b>15,8</b> (9,3 – 24,4)
	-129T>C n = 99	TT	79 ( <b>79,8</b> ; 70,7 – 87,9)	T	<b>89,4</b> (82,7 – 93,2)
		TC	19 ( <b>19,2</b> ; 11,2 – 28,3)		
		CC	1 ( <b>1,0</b> ; 0,0 – 4,0)	C	<b>10,6</b> (6,1 – 18,8)
<b>CYP3A4</b>	392A>G n = 99	AA	11 ( <b>11,2</b> ; 4,6 – 16,6)	A	<b>28,3</b> (19,5 – 37,8)
		AG	34 ( <b>34,7</b> ; 26,8 – 45,3)		
		GG	54 ( <b>54,1</b> ; 43,0 – 63,1)	G	<b>71,7</b> (62,1 – 80,5)
	673T>C n = 103	TT	100	T	100
		TC	0		
		CC	0	C	0
<b>CYP3A5</b>	6986A>G n = 84	AA	64 ( <b>76,2</b> ; 67,3 – 85,0)	A	<b>85,7</b> (77,6 – 92,1)
		AG	16 ( <b>19,0</b> ; 11,9 – 27,9)		
		GG	4 ( <b>4,8</b> ; 0,7 – 9,5)	G	<b>14,3</b> (7,9 – 22,4)
<b>CYP11A1</b>	2455A>C n = 100	AA	97 ( <b>97,0</b> ; 93,0 - 100)	A	<b>98,5</b> (93,0 – 100 )
		AG	3 ( <b>3,0</b> ; 0,0 – 7,0)		
		GG	0	G	<b>1,5</b> (0,0 – 2,7)
<b>CYP11B1</b>	4326C>G n = 103	CC	70 ( <b>68,0</b> ; 60,3 – 75,2)	C	<b>75,3</b> (19,5 – 37, 8)
		CG	15 ( <b>14,6</b> ; 8,3 – 20,3)		
		GG	18 ( <b>17,4</b> ; 9,3 – 26,6)	G	<b>24,7</b> (19,5 – 37,8)
	4360C>G n = 98	CC	89 ( <b>90,8</b> ; 85,7 – 96,4)	C	<b>95,4</b> (88,7 – 98,3)
		CG	9 ( <b>9,2</b> ; 3,6 – 14,3)		
		GG	0	G	<b>4,6</b> (3,6 – 14,3)

Continuação da tabela III.5.

Gene	SNP	Frequência genotípica N (%; IC=95%)	Frequência alélica % (IC=95%)		
<b>CYP2C8</b>	805A>T n = 96	AA	65 ( <b>67,7</b> ; 58,3 – 77,1)	A	<b>81,7</b> (73,0 – 89,0)
		AT	27 ( <b>28,1</b> ; <b>18,8</b> – 36,5)	T	<b>18,3</b> (11,0 – 27,0)
		TT	4 ( <b>4,2</b> ; 1,0 – 9,4)		
	1196A>G n = 102	AA	101 ( <b>99,0</b> ; 96,1 – 100)	A	( <b>99,5</b> ; 96,1 – 100)
		AG	1 ( <b>1,0</b> ; 0,0 – 3,9)	G	( <b>0,5</b> ; <b>0,0</b> – 1,7)
		GG	0		
	792C>G n = 100	CC	98 ( <b>98,0</b> ; 95,0 – 100)	C	98 ( <b>99,0</b> ; 96,1 – 100)
		CG	2 ( <b>2,0</b> ; 0,0 – 5,0)	G	( <b>1,0</b> ; 0,0 – 2,0)
		GG	0		

#### III.4. Doseamento dos antimaláricos AL

As amostras foram colhidas em 103 pacientes com malária por *P. falciparum* não complicada, nos dias 0 (D0), D3 e D7.

Em virtude de IHMT não possuir laboratório para a realização de HPLC, este capítulo deste trabalho foi realizado no Departamento de Química Analítica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

As amostras foram preparadas e otimizadas de acordo com o protocolo elaborado para o estudo. No entanto, os resultados preliminares obtidos não foram conclusivos por causa de avaria do cromatógrafo disponível. O que impediu a continuidade da análise durante o período de realização da componente prática deste trabalho, não tendo sido possível obter resultados relativos à quantificação do artemeter e lumefantrina nas amostras em estudo.

## **IV. Discussão**

#### IV.1. Identificação do *P. falciparum*

No que concerne à identificação do *P. falciparum*, foi observada uma diferença significativa nos resultados entre as duas técnicas utilizadas (microscopia ótica e PCR); por exemplo no D7 os resultados obtidos foram de 6% e 34%, respetivamente ( $X^2 = 15,170$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0,0001$ ). Esta diferença justifica-se pela alta sensibilidade do PCR para detetar parasitas mesmo em concentrações sub-microscópicas; pela presença de gametócitos, pela existência de vestígios de DNA de parasitas mortos e erros no diagnóstico microscópico, devido à falta de formação e más condições de coloração, têm sido também apontados como fatores que podem contribuir para a diferença entre os resultados obtidos pelas duas técnicas [72]. Para minimizar erros de diagnóstico neste estudo, a identificação do parasita pela microscopia foi realizada por técnicos qualificados, especificamente treinados para o estudo; a qualidade das amostras foi verificada e confirmada pelo investigador responsável com base nos parâmetros do protocolo utilizado.

É de referir que, todas as amostras com resultado positivo por microscopia para formas assexuadas do parasita e/ou com gametócitos, tiveram resultado positivo para *Plasmodium* por PCR nos dias correspondentes do seguimento.

Todos os casos classificados como falência terapêutica tiveram resultados positivos para o *P. falciparum* por microscopia e por PCR nos dias correspondentes.

Comparando os resultados por anos de colheita foi constatado um aumento progressivo relativo do número de amostras positivas entre 2011 e 2013 (tabela III.1.); no entanto, não se verificou que existisse associação estatisticamente significativa. Por exemplo, no D3 a distribuição das 13 amostras positivas por MO nos 3 anos de colheitas (2011, 2012 e 2013) foi de 30,8% em 2011 ( $n=4/13$ ), 30,8% ( $n=4/13$ ) correspondente a 2012 e 38,4% ( $n=5/13$ ) nas colheitas de 2013 ( $X^2 = 0,720$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0,696$ ); em 48 pacientes com PCR positivo no D3, a distribuição foi de 31,3%, 29,2% e 39,6% em 2011, 2012 e 2013 respetivamente ( $X^2 = 1,513$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,469$ ) (Ver tabela III.1.).



#### IV.1.2. Detecção de gametócitos

Foram detetados gametócitos em pacientes no D0 (n=16), nos dias subsequentes do seguimento foram identificados gametócitos em sete pacientes no D7 e em 3 no D14, tendo nos restantes dias sido identificada apenas numa amostra.

De forma geral, a produção de gametócitos ocorre após vários ciclos eritrocitários; a presença desta forma sexuada no D0 que, geralmente coincide com o início da sintomatologia, pode sugerir precedência duma infeção latente por *Plasmodium*, comum nas áreas endémicas, inicialmente assintomática com baixa parasitémia e que se tornam manifestas na ocasião de fragilidade da defesa do organismo ou duma inoculação parasitária adicional [21, 32]. A persistência de gametocitémia promove a manutenção do vetor infetado e a transmissão da doença na população [32]. A proporção de pacientes com gametócitos encontrada sugere um relevante potencial de transmissão de malária na amostra populacional em análise, o que é consistente com o nível de endemicidade da região.

#### IV.2. Resultados terapêuticos ao tratamento com a combinação AL

No D3 (24 horas após o tratamento completo com Coartem<sup>®</sup>), 13 dos 103 pacientes em análise (12,6%) apresentavam parasitémia detetada por MO.

A taxa de cura encontrada neste estudo 91,3 (IC 95%: 83,6 – 95,8) é inferior relativamente à reportada em 2004 (100%), considerada como avaliação inicial para a monitorização da eficácia de AL em Angola [73]. A falência de 8,7%, observada neste estudo, sugere uma alteração do perfil do parasita em circulação em Angola, no que concerne à suscetibilidade à combinação utilizada (AL).

Plunciski e colaboradores reportaram taxas de cura de 97,3%, 96,3% e 88,1% em estudos realizados nas províncias do Uíge, de Benguela e Zaire respetivamente, em amostras colhidas em 2013 e 2015 [74].

Taxas médias de falência <5 % têm sido reportadas na maioria dos estudos realizada na região africana; taxas dentro desta proporção foram reportadas em países subjacentes a Angola, como o caso de Congo (2,8%), República Democrática do Congo (2,4%), Etiópia, Tanzânia e Zâmbia (2,4%, 2,9% e 6,7%), respetivamente. Foram também reportadas

taxas de falências superiores a 10% em diferentes países da região africana, como no caso de Burquina Faso (12,5%) no período de 2007-2012, Gana (13,8%) em 2013 e Malawi (19,5%) em 2012 [30]. Estando os resultados obtidos neste estudo relativamente à falência terapêutica, dentro dos intervalos reportados.

Uma análise de resultados, publicada por Venkatesan e colaboradores, que envolveu 31 estudos realizados em diferentes países, reportou uma taxa média global de RCPA de 94,8 %. Nessa análise, as taxas médias de cura (RCPA) distribuídas por regiões foram de 93,8% para a África Oriental, 96,2% para a África Ocidental e 95,2% para a Ásia/Oceânia. É de referir que a maioria dos estudos incluídos nesta análise foi concluída antes de 2010 [30]; a taxa de cura relativamente inferior (91,3%), obtida neste estudo, realizado em Angola entre 2011 e 2013, não justificam uma mudança de política terapêutica do país, considerando as diretrizes da OMS [23], porém, sugere tendência para uma diminuição da eficácia terapêutica da combinação em utilização, neste caso a AL, o que reforçam a necessidade de uma monitorização regular. No anexo IV.1. encontra-se uma compilação dos estudos realizados em diferentes áreas endémicas de África, bem como as respetivas taxas de falência terapêutica reportadas.

O protocolo da OMS para a monitorização da eficácia dos ACT considera a deteção de parasitas por microscopia no D3 como uma diminuição da suscetibilidade do *P. falciparum* ao tratamento com ACT, especialmente à artemisinina. Este protocolo define a suspeita de resistência do *P. falciparum* à artemisinina como a proporção de pacientes com parasitémia de 10% ou mais no D3 e, considera a taxa de falência terapêutica (recrudescência da parasitémia) durante o período de seguimento (28 dias), como indicador da resistência ao fármaco parceiro com maior tempo de semivida [75].

Perante uma taxa falência superior a 10%, a OMS recomenda a mudança do esquema em uso [75].

Em termo de resultados terapêuticos, fatores associados ao hospedeiro humano, como por exemplo a interferência do sistema imunitário específico, principalmente em áreas endémicas de malária, e a influência da farmacogenética sobre a farmacocinética dos compostos utilizados, desempenham um papel relevante na dinâmica de eliminação dos eritrócitos infetados (*infected red blood clearance - iRBC*), com impacto na resposta terapêutica [9].

A OMS recomenda alteração da política de tratamento perante uma taxa de falência terapêutica superior a 10% [75]; a taxa de cura (91,2%) encontrada neste estudo sugere que AL ainda pode ser considerada eficaz, como fármaco de primeira linha, para o tratamento de malária não complicada, em Angola, de acordo com parâmetros da OMS; no entanto, estes resultados realçam a pertinência da monitorização periódica e abrangente da eficácia desta combinação em Angola.

### **IV.3. Análise dos polimorfismos em genes do *P. falciparum*.**

#### **IV.3.1. *pfmsp2* (proteína de superfície do merozoíto)**

A genotipagem do *pfmsp2* foi utilizada neste estudo, para distinguir recrudescências de uma nova infeção por *Plasmodium falciparum* nos pacientes em estudo. Em 27 das 96 amostras analisadas (28,1%), foram observadas bandas correspondentes à coexistência das ambas as famílias (3D7/IC e FC27); neste caso, significa a ocorrência de coinfeções com várias estirpes oriundas de diferentes inoculações [32].

Durante o período de seguimento, foi observada eliminação progressiva da heterogeneidade nas bandas e, a partir do D3, a maioria das amostras (98%, n=94) apresentou características análogas, no que concerne às famílias alélicas FC27 ou 3D7/IC. Ou seja, com o tratamento foram sendo eliminadas diferentes estirpes de *falciparum*.

Em três pacientes com amostras positivas para *P. falciparum* depois dos D7 (D14, D21 e D28), uma (correspondentes ao D14) tinha um perfil genotípico do *pfmsp2* similar ao do D0, sugerindo uma recrudescência; enquanto uma das duas amostras positivas no D28, apresentou bandas similares às do D0, sendo considerada também uma recrudescência e na segunda foram observadas bandas bastante distintas do perfil inicial, sendo, portanto, classificada como reinfeção [9].

Neste estudo, o número reduzido de amostras positivas existentes após o D7, constituiu uma limitação em termo da avaliação das taxas de recrudescência e reinfeção na área em estudo.

Em dois estudos de eficácia terapêutica da combinação AL, realizados em três províncias de Angola, e publicados por Plucinski e colaboradores em 2015 e 2017 incluindo 157 e 178 pacientes, respetivamente [74, 76], com análise da diversidade de *falciparum* por microsatélites, foram reportados 14 e 19 casos de reinfeção em 23 e 28 pacientes com falência terapêutica tardia, respetivamente.

#### IV.3.2.1. SNP's *N86Y* e *D1246Y* do gene *pfmdr1*

Neste estudo, em 96 amostras analisadas relativamente à posição 86 C>Y, o genótipo mutante *86Y* associado com a alteração da atividade da proteína apresentou uma frequência de 18,1 (IC 95%: 10,2-26,0). Este resultado está em concordância com os reportados em outros estudos realizados em Angola, onde frequência similares foram encontradas por Gama e colaboradores (11,1%) em amostras de 2007 [77] e por Fançony e colaboradores (17%) em 2016 [78]; porém, os nossos resultados mostraram uma diferença significativa quando comparado com resultados obtidos em estudos menos recentes realizados em Angola; por exemplo, o genótipo mutante *pfmdr1 86Y* foi encontrado com uma frequência de 73% por Pinheiro e colaboradores em 2003 ( $X^2 = 23,692$ ,  $P = 0,0001$ ) [79], foram demonstradas frequências de 61% num estudo que envolveu amostras colhidas no hospital pediátrico de Luanda em 2007 [80], ( $X^2 = 17,186$ ,  $P = 0,000034$ ) e de 48% num estudo realizado na província de Benguela por Ngane e colaboradores entre 2010 -2011 ( $X^2 = 10,385$ ,  $P = 0,001270$ ) [81]. Também, diferem dos resultados encontrados numa análise publicada por Venkatesan e colaboradores em 2014 [82], que envolveu resultados de vários estudos sobre malária realizados no período de 2000 a 2009, onde, o alelo mutante *86Y* foi reportado com as frequências médias de 34% para a região Ocidental de África 44% região Este da África e 29% (*86Y*) para a Ásia/Oceânia, sendo o alelo selvagem (*86N*) encontrado em 42%, 37% e 71%, nas respetivas regiões [82]. É de referir que a maioria dos estudos desta análise foi realizado num período em que a CQ e AQ eram utilizados em regime de monoterapia como fármacos de primeira linha, para o tratamento da malária não complicada, o que poderá justificar a seleção deste alelo por este regime terapêutico. De acordo com a literatura, a exposição do parasita aos antimaláricos pode resultar em mutações e seleção de estirpes menos suscetíveis aos fármacos utilizados. Por exemplo, a utilização simultânea de

antimaláricos (CQ, AQ, MQ) em regimes de monoterapia ocasionou uma pressão seletiva com propagação do alelo mutante *pfmdr1*86Y em diversas áreas endêmicas de malária; após introdução dos ACT's foi observada uma alteração do perfil genético do *P. falciparum* com aumento progressivo da frequência do alelo selvagem N86, este ressurgimento deve-se provavelmente à redução da pressão seletiva exercida pelos fármacos, resultante do abandono da cloroquina e de outros antimaláricos da mesma classe (quinoleínas). Em muitas áreas endêmicas de malária, a interrupção do uso da CQ ocasionou reaparecimento do alelo selvagem 86N e de estirpes do parasita sensíveis a este fármaco. Por exemplo, no Malawi, a substituição da CQ pela associação SP, em 1992 originou uma redução do alelo 86Y de 60% (1993) para 20% em 2000. O ressurgimento do 86N foi acompanhado pelo reaparecimento do fenótipo sensível do *P. falciparum* à CQ *in vitro* e na resposta clínica de pacientes tratados com CQ no Malawi e no Quênia (ver tabela IV.2.).

Neste estudo, foi encontrado predomínio do alelo selvagem 86N, o que por comparação com frequências reportadas em estudos anteriores, realizados em Angola, sugere uma alteração do perfil genético do *P. falciparum*. Esta alteração verificou-se após substituição da CQ em regime de monoterapia por ACT's (AL) em Angola, em 2007, o que pode influenciar as características fenotípicas no que concerne à suscetibilidade do parasita e a resposta do paciente aos antimaláricos, nomeadamente à combinação AL, aqui analisada.

Em relação ao SNP *pfmdr1* D1246Y, em 96 amostras analisadas, o genótipo selvagem (1246D) foi o predominante, tendo sido encontrado em 90% das amostras analisadas; o alelo mutante 1246Y associado a uma proteína com atividade transportadora alterada, foi encontrado em apenas uma amostra (1,0%), colhida em 2012; uma frequência semelhante (1,8%) foi encontrada num estudo em Benguela, região central de Angola em 2010-2011 [81]. Estes resultados estão de acordo com os reportados na maioria dos estudos realizados na região africana, onde o alelo mutante 1246Y tem sido raramente encontrado [41]; no entanto, esta forma alélica (1246Y) foi reportada em estudos realizados em Kinshasa—DRC, em 2008, em 15.5% (n = 16/103) das amostras, na Tanzânia 15,7% (n = 101/640) em 2014 e na Nigéria 17% (n = 15/90) em 2015. Também, na análise realizada por Venkatsan [82], que envolveu resultados de estudos de diferentes áreas geográficas, o genótipo 1246Y foi reportado com as frequências médias de 11% (n=75/678) na região

Oeste e 25% (n=254/1017) na região Este da África e, não tendo sido encontrado na Ásia e Oceânia em 77 amostras analisadas. De acordo com a bibliografia, o *pfmdr1* 1246Y é encontrado com maior frequência na região da América do Sul e considerado raro em África [75][82].

#### IV.3.2.2. Avaliação do número de cópias do gene *pfmdr1*

O aumento do número de cópia do gene *pfmdr1* tem sido associado com diminuição da suscetibilidade e aumento da resistência do *P. falciparum* *in vitro* e à falência terapêutica clínica aos antimaláricos, incluindo a mefloquina (MQ), quinino (QN), halofantrina e lumefantrina [75, 83].

Nesta amostra populacional foi observada uma proporção significativa de aumento do número de cópias do gene *pfmdr1* (11,8% n=11/93) e uma tendência progressiva relativa no aumento do número de cópias ao longo do período de colheita das amostras (de 2011 a 2013), porém, este parâmetro não apresentou uma associação estatisticamente significativa ( $P = 0,446$ ). Estes resultados são discrepantes dos relatados pela maioria dos estudos realizados na região africana, onde o aumento do número de cópias deste gene tem sido raramente reportado. Por exemplo, num estudo publicado por Witkowski em 2010 utilizando 131 amostras colhidas de diferentes países de África ocidental e central, 3% apresentaram um aumento de cópias do *pfmdr1* [83]; num outro estudo (Menard e colaboradores) que incluiu 214 amostras colhidas nos Camarões, no período entre 2005 e 2009 [84] não foi detetado aumento de cópia do *pfmdr1*; resultado semelhante foi reportado num estudo realizado por Vaughan-Williams e colaboradores em Kwazulo Natal, África do Sul, em 2012 [85]. Esta tendência foi também observada em estudos realizados na África Oriental, que envolveram 475 amostras provenientes de Quênia, Sudão, Zanzibar e Malawi, nos quais a duplicação do gene *pfmdr1* foi encontrada em apenas quatro amostras (0,8%), provenientes do Quênia e do Sudão; na região ocidental de África, em dois estudos que envolveram 112 amostras provenientes de Burquina Faso, Costa do Marfim, Togo e, também Madagascar, seis amostras (5,6%) apresentaram duplicação do gene *pfmdr1* [85]. Porém, num estudo publicado por Pillai e colaboradores em 2012 em amostra de 28 viajantes europeus portadores de malária por *P. falciparum* e

provenientes de oito países africanos, aumento do número de cópias do *pfmdr1* foi observado em 39% dos casos [86].

Na análise já mencionada, publicada por Venkatsan, que envolveu resultados de estudos realizados em diferentes áreas geográficas, a amplificação do gene *pfmdr1*, pelo aumento do número de cópias, foi reportada com frequências médias de 2% (n=41/2033) na região Este da África e de 50% (n=103/226) na Ásia e Oceânia, não tendo sido mencionado dados sobre este parâmetro para a África Ocidental [82]. Não foram encontrados dados referentes a estudos sobre este polimorfismo, em Angola, que possam ser utilizados como perfil de comparação do mesmo nesta população. No entanto, o resultado encontrado neste estudo constitui uma preocupação, considerando que o aumento do número de cópia do gene *pfmdr1* tem sido associado com a diminuição da suscetibilidade do *P. falciparum* a diversos antimaláricos. Este fato foi constatado num estudo realizado na região oeste da Tailândia, onde tem sido reportado *Plasmodium falciparum* resistente à maioria dos antimaláricos. Foi encontrado aumento do número de cópias do *pfmdr1* em 35% (n = 19/54) e, as amostras com número de cópias aumentado apresentavam IC50s superiores para a mefloquina e artesunato [87].

A detecção deste fenómeno é considerada como um sinal de alerta atempada para o surgimento da resistência do parasita aos fármacos mencionados, o que sugere a necessidade de uma maior vigilância em termos de monitorização dos parâmetros associados à resistência aos antimaláricos em Angola.

#### **IV.3.2.3. Análise do SNP S769N do gene *pfATPase6***

No gene *pfatpase6*, foi analisado o polimorfismo S769N; a totalidade das amostras incluídas no estudo (n=103) apresentou alelo tipo selvagem S769.

Este resultado é concordante com o obtido por Menegon e colaboradores, num estudo realizado na província do Uíge, região norte de Angola em 2004, onde o alelo selvagem S769 foi encontrado em 100% das amostras (n=66) [88]. Resultados semelhantes foram reportado em estudos realizados em diferentes regiões de África; a mutação neste *locus* (769N) também não foi observado em estudos efetuados na Tanzânia e no Níger [89]; O polimorfismo S769N do gene *pfATPase6* tem sido associada à diminuição da suscetibilidade do *P. falciparum* à artemisinina *in vitro*; a detecção deste alelo em amostras

provenientes da Guiana Francesa foi associada a elevados níveis de  $CI_{50}$  deste fármaco [86]. Num estudo *in vitro* recorrendo a culturas de isolados de *Plasmodium falciparum* de viajantes provenientes de África (já mencionados), foram observados valores de  $IC_{50}$  elevados para artesunato, artemisinina e Dihidroartemisinina em amostras portadoras do alelo mutante *pfATP6 769N* [86]; no entanto, Cui e colaboradores [90], utilizando estirpes selvagens e mutantes para este códon, demonstraram que a mutação *769N* não afetava a resposta dos parasitas ao artemeter, ao artesunato e à dihidroartemisinina. Estes resultados divergentes apontam para a necessidade de esclarecimento quanto ao papel desempenhado por este polimorfismo na resistência à artemisinina e seus derivados.

#### IV.3.2.4. Análise de polimorfismos no gene *pfK13*-propeller

Em 21 amostras analisadas para os polimorfismos no gene *pfK13* nos codões *493(Y>H)*, *539 (R>T)*, *I543T (I>T)* e *C580 (C>Y)*, não foram encontradas nenhuma das mutações associados com resistência do *P. falciparum* à artemisinina, detetada no Sudeste Asiático [91]. Portanto, não foi observada qualquer associação estatisticamente significativa entre os SNP's estudados e a resposta terapêutica à combinação AL (anexo IV.3.).

Os nossos resultados estão em concordância com os reportados por Plucinski e colaboradores num estudo realizado em duas províncias da região norte de Angola (Uíge e Zaire), em 2013 [74], e noutro estudo publicado por Escobar e colaboradores em 2016, utilizando amostras provenientes de Mozambique (n=50) e Angola (n=50), colhidas no período de 2003 a 2012 nas quais também não foram encontradas mutações nos codões do gene *pfk13* analisadas neste estudo [92].

Resultados semelhantes foram reportados em dois estudos da avaliação dos polimorfismos deste gene (*pfk13*) em amostras colhidas na África subsaariana. Um dos estudos incluiu 1100 amostras positivas para *P. falciparum* colhidas em 14 países a partir de 2002 e o outro envolveu 1212 amostras colhidas em 12 países em 2013 e 2014; em ambos, não foram detetadas mutações no *pfk13* analisadas neste trabalho, sugestivas de resistência do *P. falciparum* à artemisinina.

De acordo com a bibliografia, estão identificadas cerca de 60 mutações no gene *pfK13* em África e no sudeste asiático, das quais a mutação sinónima no códon *V494I* adjacente ao códon *Y493H* analisado neste estudo e as mutações em codões *R471R* e *R575R*, já



detetadas em amostras de Angola e de outros países adjacentes como RDC Congo, Gabão e Mozambique [93].

Mutações do *pfK13-propeller* nos codões *Y493H*, *R539T*, *I543T* e *C580Y* analisadas neste estudo, foram associadas com a resistência do *P. falciparum* à artemisinina e derivados na área do grande Mekong, região do Sudeste Asiático [42]. Em 2014, a Organização Mundial de Saúde incluía mutações no *pfK13* como marcadores moleculares de resistência do *P. falciparum* à artemisinina; os indicadores da OMS para monitorização dos ACT, definem a suspeita de resistência à artemisinina como a presença de mutações associadas com a resistência a este antimalárico no gene *pfk13* em 5% dos pacientes analisados e, define resistência confirmada como a presença de mutações no gene *pfK13* associadas com parasitémias persistentes no D3 ou com a persistência de parasitemia durante o período de seguimento [91].

Apesar de não terem sido encontradas mutações associadas à resistência à artemisinina fora da área do grande Mekong, a deteção de mutações sinónimas em diferentes codões do gene *pfk13* em África, constitui um alerta para a necessidade de monitorização destes marcadores de resistência do parasita aos ACT's nesta região.

#### **IV.4. Polimorfismos em genes do hospedeiro humano**

O comportamento da doença e a resposta aos fármacos são influenciados por múltiplos fatores, incluindo o estado geral do paciente, características genéticas da população, aspetos farmacológicos e qualidade dos medicamentos [32]. Os estudos dos polimorfismos genéticos no humano visam principalmente identificar variações em genes, associados à predisposição a doenças e à componente farmacogenética, que analisa o comportamento fenotípico associado à farmacocinética, farmacodinâmica e a modulação de respostas terapêuticas, a eficácia e segurança dos medicamentos na população, com o objetivo de contribuir para o controlo de doenças e a melhoria dos regimes terapêuticos [27, 94].

Neste trabalho, analisámos polimorfismos em genes *MDR1/ABCB*, *CYP3A4* e *CYP3A5* do hospedeiro humano por estarem envolvidos no metabolismo da combinação AL; foram também analisados SNP's nos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP2C8* por estarem

associados ao metabolismo da AQ, componente da ACT (Ars + AQ) também utilizada em Angola.

#### IV.4.1. Frequências genótípicas dos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP2C8*

Em relação aos SNPs nos genes acima mencionado, neste estudo, as variantes alélicas que codificam para proteínas com atividade enzimática alterada apresentaram as seguintes frequências: 24,7% (*CYP1A1*\*2B), 18,3% (*CYP2C8*\*2) à 0,5% (*CYP2C8*\*4). Esses genes (*CYP1A1*, *CYP1B* e *CYP2C8*) foram analisados neste estudo por causa do seu envolvimento no metabolismo da amodiaquina.

A amodiaquina, é um componente importante das ACT's em Angola, é biotransformada no seu metabolito mais ativo, o desetilamodiaquine (DEAQ) por enzimas do CYP450, incluindo as isoformas codificadas pelos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP2C8* e analisados neste trabalho. Foram analisados, particularmente, os SNPs *CYP2C8*\*2, \*3, \*4; *CYP1B1*\*3/\*5, associados a proteínas de atividade enzimática diminuída e o *CYP1A1*\*2B, que codifica uma enzima de atividade acentuada, por estarem envolvidos no metabolismo da AQ, na formação do metabolito reativo, quinina-imina (QI), associado aos efeitos adversos deste fármaco [48, 49].

Pensa-se que a ação de enzima de atividade metabólica baixa, como por exemplo *CYP2C8*\*3, \* 4 e *CYP1B1*\*6, origina uma maior exposição à fração de AQ não convertida em DEAQ, a qual uma enzima de atividade rápida, como *CYP1A1*\*1B pode converter rapidamente esta fração remanescente no metabolito QI [95].

O quadro clínico de efeitos adversos resultantes do QI é caracterizado por neutropenia e por vezes insuficiência hepática grave. Tendo também sido relatado um quadro de neutropenia assintomática associado a estes genes (*CYP1A1* e *CYP1B1*), em pacientes submetidos regularmente a um esquema terapêutico contendo AQ. Este quadro clínico muitas vezes desconhecido pelo paciente, é detetado na realização de exames complementares efetuados por outros motivos.

A localização extra-hepática destas enzimas pode explicar o fato do tecido sanguíneo ser o local da ocorrência dos efeitos adversos como a neutropenia, como provável efeito da QI [48].

As frequências das variantes com atividade enzimática alterada encontradas neste estudo representam um valor numérico relevante no que concerne a população de Angola, relativamente ao risco de desenvolvimento de efeitos adversos à amodiaquina.

É de referir que, em Angola, na altura da implementação da quimioprofilaxia da malária em gestantes usando um esquema terapêutico à base de AQ, existiram relatos, não documentados, de efeitos adversos, com nível de gravidade variável, após medicação com o referido antimalárico. A existência de relatos de efeitos adversos constituiu um obstáculo à aderência da população ao programa de profilaxia das gestantes. Não foram encontradas referências bibliográficas ou relatórios de farmacovigilância sobre a análise dos efeitos adversos resultantes do tratamento contendo AQ em Angola.

#### IV.4.2. Frequência genotípica dos genes *CYP3A4* e *CYP3A5*

Para o SNP *CYP3A4* 392A>G, a variante *CYP3A4\*1B* que representa o alelo mutante (392G) associada a uma enzima com atividade reduzida, apresentou uma frequência genotípica (392GG) de 54,5%, sendo a frequência alélica de 71,7% (IC 95%: 62,1 – 80,5). Estes resultados estão em concordância com os reportados em estudos nas populações africanas onde frequências semelhantes foram encontradas, por exemplo em populações de São Tomé e Príncipe e Zanzibar (78%), em Moçambique e na África do Sul (73%) e na Guiné Bissau e na Tanzânia (74%) [96]. Em anexo VIII.6. podem ser observadas as diferentes frequências obtidas nos diversos estudos realizados em vários países.

Para o SNP *CYP3A4* 673T>C, a totalidade das amostras analisadas apresentou o alelo selvagem (673TT); este resultado está também em concordância com os reportados em estudos de populações africanas onde o alelo mutante nesta posição (673-T / *CYP3A4\*2*) tem sido raro, apresentando frequências entre 0% e 1%.

Em relação ao SNP *CYP3A5* 6986A>G, a frequência encontrada para o alelo mutante 6986-G (*CYP3A5\*3*) foi de 4,8% (GG), este alelo está associado com a síntese da proteína com atividade reduzida, sendo a frequência alélica (6986-G) de 14,3% (IC 95%: 7,9-22,4), estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados na região africana; por exemplo, frequências semelhantes foram reportadas em estudos realizados nas populações de África do Sul, Gana e Quênia (15%), no Zimbabué (16%), na Zâmbia

(18%), nas populações de Congo Brazzaville, Gabão, Gâmbia e Tanzânia (20%) e 24% nos Camarões [56, 96]; enquanto frequências alélicas de cerca de 80% foram reportadas em estudos de populações na Argélia, Marrocos e Tunísia. As frequências obtidas nestes estudos encontram-se compiladas no anexo IV.4.

Esta variante (*CYP3A5*\*3) apresenta uma variabilidade associada a raças; é considerado predominante na população Caucasiana [97], apresentando frequências > 95%; foram reportadas frequências de 90%, 73%, 71%, 70% e 27% em estudos de populações norte-americana, chinesa, japonesa, coreana e afro-americana, respetivamente (anexo VII.6.).

#### **IV.4.3. Frequência genotípica no *ABCB1/MDR1***

No que concerne o gene *ABCB1*, o genótipo mutante associado com a proteína de atividade alterada apresentou as frequências de 6,9% e 1% nas posições 3435 (*TT*) e 129 (*CC*) respetivamente, sendo as frequências alélicas de 12,7% (IC 95%: 7,1-21,2) para 3435*T* e 10,6% (IC 95%: 6,1-18,8) para 129*C*. Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com as frequências médias reportadas em estudos realizados noutras populações africanas (anexo VIII.6). Por exemplo, o genótipo mutante 3435 (*TT*) foi encontrado com as frequências de 1%, 7, 4% e 6% e 7% em amostras provenientes de Zanzibar, São Tomé e Príncipe, Quênia e Sudão, respetivamente, não tendo sido encontrado este alelo num estudo realizado na população do Gana [98]. Num estudo realizado por Isa Cavaco e colaboradores na população portuguesa, o genótipo 3435*TT* foi encontrado em 41% das amostras [99]; tal como esperado este genótipo foi reportado com maiores frequências, em diferentes estudos, realizados em populações caucasianas, em comparação com os resultados aqui apresentados [100].

Em relação ao SNP -129*T>C*, os resultados deste estudo estão também de acordo com os reportados em diferentes estudos, onde o genótipo mutante 129*CC* foi raramente encontrado em populações Africanas [100] (anexo VIII.6.).

De forma geral, os *SNP's* 3435 *C>T* e -129*T>C* são considerados silenciosos, o que significa que não ocorre alteração do aminoácido na posição correspondente da sequência proteica, porém, estão associados a alterações no nível da sua expressão e da atividade da

P-gp resultante [101]. Os portadores do genótipo mutante homozigótico nestes SNP's têm sido associados à P-gp com baixos níveis de atividade transportadora, quando comparado com os níveis do genótipo selvagem, enquanto os indivíduos heterozigóticos apresentam um fenótipo intermédio.

#### **IV.4. Associação entre os SNP's de humano analisados e a resposta ao tratamento com AL**

Em relação ao resultado do tratamento com AL, não foi encontrada uma associação estatística significativa entre os pacientes portadores das variantes alélicas *CYP3A4\*1B* e *CYP3A5\*3* e o registo de parasitemia no D3. (anexo IV.5.).

Considerando a ACT utilizado neste estudo, o estatuto da parasitemia no D3, está mais associado com a ação do Artemeter, o parceiro de ação rápida e com tempo de semivida curto, que desempenha um papel importante na eliminação dos eritrócitos infetados (iRBC); este composto é metabolizado ao nível dos microssomas hepáticos pelas enzimas *CYP3A4/5* sendo convertido no seu principal metabólito biologicamente ativo, a dihidroartemisinina (DHA); ambos os componentes (artemeter e DHA) são rapidamente eliminados do plasma, com uma semivida de eliminação de cerca de 2 horas [19].

As variantes alélicas *CYP3A4\*1B* e *CYP3A5\*3* que representam proteínas de atividade enzimática lenta tendem causar altas concentrações de fármacos, maior potencial terapêutica e toxicidade.

Neste estudo, o genótipo mutante *CYP3A4\*1B* foi encontrado com uma frequência relativamente maior (64,6%) no grupo de pacientes com PCR positivo no D3 comparado com 40,8% do grupo com resultado negativo ( $\chi^2 = 3,322$  DF = 1,  $p = 0,0683$ ); para o *CYP3A5\*3*, a correlação entre os dois grupos foi respetivamente de 2,3% e 7,7% ( $\chi^2 = 2,335$  df = 1,  $p = 0,126$ ), portanto, esses parâmetros (estatuto genotípico e parasitemia) não apresentaram uma associação estatisticamente significativa (anexo IV.5).

O perfil genotípico do *CYP3A4\*1B* e do *CYP3A5\*3* também não influenciou o risco de recorrência da parasitemia durante o período de seguimento de 28 dias; este período está relacionado com o efeito protetor da LUM, que é metabolizado em N-desbutil-lumefantrina (DLF) ao nível dos microssomas hepáticos, principalmente pela *CYP3A4* sendo muito lentamente eliminado, apresentando um tempo de semivida de 26 dias. É de

referir que, em condições regulares, a exposição sistêmica ao metabólito desbutil-lumefantrina, cujo efeito antiparasitário *in vitro* é 5 a 8 vezes mais elevado do que o da lumefantrina, é cerca de 10% da exposição ao composto original, sendo a maioria da lumefantrina eliminada inalterada. O que significa que o impacto da atividade do CYP3A4 e/ou CYP3A5 na modulação do resultado terapêutico de AL será limitado a variações da fração de LUM biotransformada em DBB, que é pequena (>10%) [19].

Os SNP do gene *ABCB1* /*MDR1* (3435C>T e -129T>C) também não apresentaram uma associada significativa com a positividade do PCR no D3, sendo a correlação entre os dois grupos (com PRC + e PCR negativo):  $\chi^2 = 0,058$  (df = 1, p = 0,810) para o *ABCB1*-3435TT e  $\chi^2 = 5,529$  (df = 2, p = 0.070) para o *ABCB1*-129CC, respetivamente (anexo IV.6.).

No entanto, o genótipo *ABCB1* 3435TT apresentou uma frequência significativamente maior nos pacientes que tiveram infecção recorrente durante o período de seguimento em comparação com o grupo de pacientes sem recorrência ( $\chi^2 = 20,517$  DF = 1, p = 0,0001) (anexo IV.6.), o que sugeriu um envolvimento desta forma mutante da P-glicoproteína, da qual se esperava que originasse níveis de concentração mais elevados do substrato, devido à sua menor atividade de transporte, e consequentemente maior eficiência na eliminação do parasita [101].

Em condições normais, espera-se que os portadores desses alelos mutantes (*CYP3A1*\*1B, *CYP3A5*\*3 e *ABCB1*-3435TT), classificados como metabolizadores lentos (PM), apresentem níveis de concentração sistêmica elevados de substratos e, consequentemente maior potencial antiparasitário.

Os nossos resultados não refletem os padrões clássicos esperados relativamente à correlação farmacogenética - farmacodinâmica, associados ao tratamento com AL. Existem diversos fatores que podem ter influencia nos resultados observados entre os quais: a) o estatuto de metabolizador lento (PM) das variantes *CYP3A4*\*1B e *CYP3A5*\*3 na conversão dos compostos iniciais (artemeter e LUM) em (DHA e DLF) respetivamente, os principais metabólitos mais ativos contra o *P. falciparum*, principalmente da *CYP3A4*\*1B, cuja frequência na nossa amostragem é relativamente elevada; b) a localização dessas enzimas (*CYP3A1*\*1B, *CYP3A5*\*3 e *ABCB1*-3435TT) ao

nível da linha celular intestinal humana LS174T, que pode originar uma redução da absorção intestinal do AL administrado por via oral; c) por outro lado, a localização hepática dessas formas mutantes pode acelerar a eliminação dos compostos de AL, pela via biliar [102].

Outros fatores a ter em consideração nas alterações da resposta terapêutica à AL incluem, o fato da absorção de artemisinina e lumefantrina ser aumentada com a ingestão de alimentos ricos em gorduras; o efeito indutor do artemeter e DHA sobre a atividade CYP3A4/5, principalmente quando estes compostos são usados a longo prazo; a interação dos componentes de AL com os outros fármaco; os fármacos que possuem efeito indutor da CYP3A4, principalmente os antirretrovirais, como inibidores de protease de HIV e inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa [19],

Uma limitação do presente estudo é a indisponibilidade de dados de farmacocinética, nomeadamente a avaliação dos níveis de concentração da LUM ao D7, para a realização de avaliação da existência de relação entre a farmacocinética e a farmacogenética. No entanto, os nossos resultados estão de acordo com dados recentes de Maganda e colaboradores onde foi sugerida uma associação entre o genótipo mutante ABCB1 3435TT, e uma diminuição significativa dos níveis lumefantrina D7, entre os doentes com menor taxa de cura após tratamento com AL [103]

## **V. Considerações Finais**



Em relação à eficiência terapêutica de AL, a taxa de cura obtida nesta amostra populacional de Luanda (91,3%) é relativamente inferior em comparação com as taxas médias de 95% que foram reportadas na maioria dos estudos realizada na região africana. De ponto de vista genético, os resultados deste estudo sugerem uma alteração do perfil do gene *pfmdr1* do *P. falciparum* associado à suscetibilidade à AL, em comparação com os dados de 2004, no entanto, o resultado clínico após o tratamento com o AL não foi associado com os SNP's analisados. Considerando as diretrizes da OMS, a taxa de falência encontrada não justifica uma mudança de política terapêutica do país, mas reforçam a necessidade de uma monitorização regular.

Em relação à análise genética no hospedeiro humano, os SNP's analisados apresentaram frequências genotípicas semelhantes às reportadas noutros estudos em populações africanas. Não foram observadas associações significativas entre os SNP's analisados nos genes *CYP3A4/5* e o tratamento com AL; no entanto, verificou-se maior frequência do alelo mutante do gene *ABCB1 3435TT* em pacientes com parasitêmia recorrente por PCR, sugerindo o envolvimento deste transportador na resposta ao tratamento com AL.

As frequências das variantes alélicas *CYP1A1\*2B* (24,7%), *CYP2C8\*2* (18,3%) e *CYP2C8\*4* (0,5%) associadas à atividade enzimática alterada encontradas neste estudo representam um valor relevante no que concerne o risco da ocorrência de efeitos adversos ao esquema de tratamento contendo amodiaquina

De forma geral, consideramos que o presente estudo constitui uma contribuição relevante, que pode ser utilizada no âmbito da análise do perfil genético da população em Angola e da resposta aos antimaláricos.

## **VI. Referências Bibliográficas**

- [1] D. P. Neves, R. Wagner, D. A. Vitor, S. Mastigophora, A. M. Siqueira, M. Suzan, M. Michalick, L. T. Americana, O. Genaro, A. B. Reis, and O. Genaro, *Parasitologia Humana*. 2005.
- [2] WHO, *World Malaria Report 2017*. 2017.
- [3] C. H. Coelho, J. Y. A. Doritchamou, I. Zaidi, and P. E. Duffy, “Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium,” *npj Vaccines*, vol. 2, no. 1, p. 34, 2017.
- [4] World Health Organization, “Guidelines for the treatment of malaria – 3rd edition,” *World Heal. Organ.*, pp. 71–88, 2015.
- [5] K. J. Arrow, C. Panosian, and H. Gelband, *Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*. 2004.
- [6] E. a Winzeler and M. J. Manary, “Drug resistance genomics of the antimalarial drug artemisinin,” *Genome Biol.*, vol. 15, no. 11, p. 544, 2014.
- [7] M. Roederer, H. McLeod, and J. Juliano, “Can pharmacogenomics improve malaria drug policy?,” *Bull. World Health Organ.*, vol. 89, no. 11, pp. 838–845, 2011.
- [8] Who, “Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy,” *World Heal. Organ.*, p. 90, 2009.
- [9] M. A. P. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, *Microbiologia Médica*, no. 1. 2014.
- [10] I. C. F. R. Ferreira and R. M. V Abreu, “Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos,” *Bioanálise*, vol. 2, pp. 32–39, 2007.
- [11] V. R. de Mendonça and M. Barral-Netto, “Immunoregulation in human malaria: The challenge of understanding asymptomatic infection,” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 110, no. 8, pp. 945–955, 2015.
- [12] L. D. Mioto, L. Carla, F. Galhardi, M. K. Amarante, and M. K. Amarante, “Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária Parasitological and immunological aspects of malaria,” pp. 42–55, 2012.
- [13] J. Williams, “Manual de Entomologia da Malária Para Técnicos de Entomologia e Controlo de vectores (Nível Básico),” 2012.
- [14] P. Vorgelegt, P. Fakult, and I. Basel, “vecteurs du paludisme en milieu semi-naturel au centre de la Côte d ’ Ivoire INAUGURALDISSERTATION,” 2014.
- [15] R. Carter and K. N. Mendis, “Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 4, pp. 564–594, 2002.
- [16] I. de R. pour le Développement, “Vaincre le paludisme (3),” in *Suds en ligne*, no. 3, 2012, p. 25.
- [17] L. LONGO, FAUCI, KASPER, HAUSER, JAMESON, “MEDICINA INTERNA de HARRISON 18º edição,” 2013.
- [18] J. P.-W. and P. C. for J. W Bailey, J. Williams, B. J. Bain, “Guideline: The Laboratory Diagnosis of Malaria,” *Br. Soc. Haematol.*, vol. XXXIII, no. 2, pp. 81–87, 2012.
- [19] E. Novartis Pharmaceuticals Corporation - Suffern, Nova Iorque and ®, “COARTEM ®,” pp. 1–15, 2013.
- [20] Laurence L. Bruton; John S. Lazo; Keith L. Parker, “Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics.” p. Local Anesthetics, 2006.
- [21] R. K. Mehlotra and P. a Zimmerman, “Resistance to Antimalarial Drugs : Parasite and Host Genetic Factors,” pp. 81–124, 2006.
- [22] K. B. Beshir, R. L. Hallett, A. C. Eziefula, R. Bailey, J. Watson, S. G. Wright, P.

- L. Chiodini, S. D. Polley, and C. J. Sutherland, "Measuring the efficacy of anti-malarial drugs in vivo: quantitative PCR measurement of parasite clearance.," *Malar. J.*, vol. 9, no. 1, p. 312, Jan. 2010.
- [23] R. Who, "Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (Gpare)," 2011.
- [24] K. Dronamraju, P. Arese, and J. Haldane, *Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects*, no. March 2016. 2006.
- [25] P. Taavitsainen, P. Honkakoski, R. Juvonen, O. Pelkonen, and H. Raunio, "Role of Xenobiotic Metabolism in Drug Discovery and development."
- [26] J. D. Waight, C. Netherby, M. L. Hensen, A. Miller, Q. Hu, S. Liu, P. N. Bogner, M. R. Farren, K. P. Lee, K. Liu, and S. I. Abrams, "CYP450 and MDR1 subfamilies: theoretical notions," *Uma ética para quantos?*, vol. XXXIII, no. 2, pp. 81–87, 2014.
- [27] N. Bozina, V. Bradamante, and M. Lovrić, "Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk.," *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, vol. 60, no. 2, pp. 217–242, 2009.
- [28] C. Santiago, C. Santiago, F. Bandrés, F. Bandrés, F. Gómez Gallego, and F. Gómez Gallego, "Polimorfismos de citocromo p450: papel como marcador biológico," *Med. del Trab.*, vol. 11, no. 3, pp. 130–140, 2002.
- [29] D. J. Conway, "Molecular epidemiology of malaria.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 188–204, Jan. 2007.
- [30] WHO, "Global report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance:2000-2010," *Geneva World Heal. Organ.*, 2010.
- [31] P. B. Bloland, "Drug resistance in malaria," *World Health*, vol. 41, no. 3–4, pp. 45–53, 2001.
- [32] C. Lynch and J. Tulloch, "Synthesis of the Current Evidence on the Multiple Causes of Malaria Drug Resistance," no. May, 2014.
- [33] T. Mita and K. Tanabe, "Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance.," *Jpn. J. Infect. Dis.*, vol. 65, pp. 465–75, 2012.
- [34] M. J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. a Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.-S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. a Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. a Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser, and B. Barrell, "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*," *Nature*, vol. 419, no. 6906, pp. 498–511, 2002.
- [35] S. Olson, S. Robinson, and R. Giffin, *Accelerating the Development of Biomarkers for Drug Safety: Workshop Summary*. 2009.
- [36] P. Rohrbach, C. P. Sanchez, K. Hayton, O. Friedrich, J. Patel, A. B. S. Sidhu, M. T. Ferdig, D. a Fidock, and M. Lanzer, "Genetic linkage of *pfmdr1* with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*," *EMBO J.*, vol. 25, no. 13, pp. 3000–3011, 2006.
- [37] M. Shah, Y. Omosun, A. Lal, C. Otero, W. Gatei, K. Otieno, J. E. Gimnig, F. Ter Kuile, W. A. Hawley, B. Nahlen, S. Kariuki, E. Walker, L. Slutsker, M. Hamel, and Y. P. Shi, "Assessment of molecular markers for anti-malarial drug resistance after the introduction and scale-up of malaria control interventions in western Kenya," *Malar. J.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–14, 2015.

- [38] Global Malaria Programme, “Emergence and spread of artemisinin resistance calls for intensified efforts to withdraw oral artemisinin-based monotherapy from the market,” *WHO Publ.*, no. May, pp. 1–15, 2014.
- [39] B. Arnou, C. Montigny, J. P. Morth, P. Nissen, C. Jaxel, J. V Møller, and M. le Maire, “The *Plasmodium falciparum* Ca(2+)-ATPase PfATP6: insensitive to artemisinin, but a potential drug target.,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 39, no. 3, pp. 823–831, 2011.
- [40] A. CORREIA, A. GOMES, and J. EIRA, “MECANISMO DE ACÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS E EMERGÊNCIA DE Índice,” 2011.
- [41] R. Jambou, A. Martinelli, J. Pinto, S. Gribaldo, E. Legrand, M. Niang, N. Kim, L. Pharath, B. Volnay, M. T. Ekala, C. Bouchier, T. Fandeur, P. Berzosa, A. Benito, I. D. Ferreira, C. Ferreira, P. P. Vieira, M. D. G. Alecrim, O. Mercereau-Puijalon, and P. Cravo, “Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (PfSERCA) gene diversity,” *PLoS One*, vol. 5, no. 2, 2010.
- [42] F. Arieu, B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A.-C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Ménard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J.-C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon, and D. Ménard, “A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria.,” *Nature*, vol. 505, no. 7481, pp. 50–5, Jan. 2014.
- [43] S. M. Taylor, C. M. Parobek, D. K. De Conti, K. Kayentao, S. O. Coulibaly, B. M. Greenwood, H. Tagbor, J. Williams, K. Bojang, F. Njie, M. Desai, S. Kariuki, J. Gutman, D. P. Mathanga, A. Mårtensson, B. Ngasala, M. D. Conrad, P. J. Rosenthal, A. K. Tshefu, A. M. Moormann, J. M. Vulule, O. K. Doumbo, F. O. Ter Kuile, S. R. Meshnick, J. A. Bailey, and J. J. Juliano, “Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa: A molecular epidemiologic study,” *J. Infect. Dis.*, vol. 211, no. 5, pp. 680–688, 2015.
- [44] M. Fakruddin and A. Chowdhury, “Pharmacogenomics- the promise of personalized medicine,” *Bangladesh J. Med. Sci.*, vol. 12, no. 4, pp. 346–356, 2013.
- [45] W. E. Evans and M. V Relling, “Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics.,” *Science (80-. )*, vol. 286, no. 5439, pp. 487–491, 1999.
- [46] J. Y. Hong and C. S. Yang, “Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 105, no. SUPPL. 4, pp. 759–762, 1997.
- [47] M. Ingelman-Sundberg, “Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms.,” *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, vol. 369, no. 1, pp. 89–104, Jan. 2004.
- [48] J. Gil, “The pharmacogenetics of the antimalarial amodiaquine,” *Clin. Appl. Pharmacogenetics*, pp. 223–248, 2012.
- [49] I. Cavaco, R. Piedade, M. I. Msellem, a Bjorkman, and J. P. Gil, “Cytochrome 1A1 and 1B1 gene diversity in the Zanzibar islands.,” *Trop. Med. Int. Health*, vol. 17, no. 7, pp. 854–7, Jul. 2012.
- [50] G. O. Adjei, B. Q. Goka, O. P. Rodrigues, L. C. G Hoegberg, M. Alifrangis, J. AL Kurtzhals, and G. Obeng Adjei, “Amodiaquine-Associated Adverse Effects After Inadver- Tent Overdose and After a Standard Therapeutic Dose,” *Ghana*

- Med. J.*, vol. 43, no. 3, pp. 4–7, 2009.
- [51] J. S. Lee, H. S. Cheong, L. H. Kim, J. O. Kim, D. W. Seo, Y. H. Kim, M. W. Chung, S. Y. Han, and H. D. Shin, “Screening of genetic polymorphisms of CYP3A4 and CYP3A5 genes,” *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 17, pp. 479–484, 2013.
  - [52] A. Gallego Fernández, M. A. de Sande García, A. M. Marín Fernández, S. Blanco Ramos, and M. J. González Galán, *Aspectos fundamentales del citocromo P450*. 2011.
  - [53] O. Doutora, V. Linda, R. Marques, C. D. José, P. Planco, P. Gil, D. José, P. Planco, P. Gil, D. M. Sofia, P. Duarte, A. Cardoso, D. Vera, and L. Ribeiro, “MOLECULAR DETERMINANTS OF THE RESPONSE TO MALARIA THERAPEUTICS,” 2007.
  - [54] N. Pinto and M. E. Dolan, “Clinically Relevant Genetic Variations in Drug Metabolizing Enzymes,” pp. 487–497, 2011.
  - [55] R. K. Bains, “African variation at Cytochrome P450 genes: Evolutionary aspects and the implications for the treatment of infectious diseases,” *Evol. Med. public Heal.*, vol. 2013, no. 1, pp. 118–34, 2013.
  - [56] R. K. Bains, “Molecular diversity and population structure at the CYP3A5 gene in Africa.”
  - [57] D. P. Bezerra, “A glicoproteína P e o gene MDR1,” 2011.
  - [58] Z. S. Sarkadi, “Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters : Participation in a Chemoimmunity Defense System,” vol. 1, pp. 1179–1236, 2006.
  - [59] Y. H. Li, Y. H. Wang, L. Yang, L. I. Yan-hong, W. Yong-hua, L. I. Yan, and Y. Ling, “MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance,” *Yi Chuan Xue Bao*, vol. 33, no. 2003, pp. 93–104, 2006.
  - [60] M. L. T. Cossio, L. F. Giesen, G. Araya, M. L. S. Pérez-Cotapos, R. L. Vergara, M. Manca, R. a. Tohme, S. D. Holmberg, T. Bressmann, D. R. Lirio, J. S. Román, R. G. Solís, S. Thakur, S. N. Rao, E. L. Modelado, A. D. E. La, C. Durante, U. N. a Tradición, M. En, E. L. Espejo, D. E. L. a S. Fuentes, U. A. De Yucatán, C. M. Lenin, L. F. Cian, M. J. Douglas, L. Plata, and F. Héritier, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, vol. XXXIII, no. 2. 2012.
  - [61] K. L. Fung, “A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function,” *NIH Public Access*, vol. 1794, no. 5, pp. 860–871, 2010.
  - [62] C. M. Lewandowski, “Inquérito de Indicadores de Malária em Angola, 2011,” *ICF Int. Calverton, Maryland, USA*, vol. 1, 2011.
  - [63] G. Snounou, S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, and K. N. Brown, “Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 58, no. 1993, pp. 283–292, 1993.
  - [64] K. Kiaco, J. Teixeira, M. Machado, V. do Rosário, and D. Lopes, “Evaluation of artemether-lumefantrine efficacy in the treatment of uncomplicated malaria and its association with pfmdr1, pfatpase6 and K13-propeller polymorphisms in Luanda, Angola,” *Malar. J.*, vol. 14, no. 1, p. 504, 2015.
  - [65] S. Berczky, A. Mårtensson, J. P. Gil, and A. Färnert, “Short report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 72, no. 3, pp. 249–251, Mar. 2005.
  - [66] B. Singh, a Bobogare, J. Cox-Singh, G. Snounou, M. S. Abdullah, and H. a Rahman, “A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction

- malaria detection assay for epidemiologic studies.,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 60, no. 4, pp. 687–92, Apr. 1999.
- [67] D. Lopes, “Resistência a antimaláricos em *Plasmodium Falciparum*: envolvimento dos genes *pfert* e *pfmdr1*,” Lisboa, 2004.
- [68] C. M. Novais and M. Pires-alves, “PCR em tempo real,” *Previs. Biotecnol. Ciência Desenvolv.* ., vol. Edição nº, pp. 10–13, 2004.
- [69] I. Ferreira, “Estudos de susceptibilidade à artemisinina e derivados em *Plasmodium falciparum*,” Lisboa, 2008.
- [70] R. S. Mannu, “Mass Spectrometric Applications for the Quantitative Analysis of Dried Blood Spot and Capillary Micro-Sampling Techniques Ranbir Singh Mannu MSc by Research in Chemistry University of York Department of Chemistry,” no. February, 2014.
- [71] B. Sridhar, K. H. Rao, T. V. Sai Srinivas, V. Seshu Madhuri, and J. V. L. N. S. Madhuri, K and Rao, “A Validated Reverse Phase HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Artemether And Lumefantrine In Pharmaceutical Dosage Forms,” *Int. J. Adv. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 95–99, 2010.
- [72] G. M. Programme, “Technical consultation to update the WHO Malaria microscopy quality assurance manual,” no. March, 2014.
- [73] J. P. Guthmann, S. Cohuet, C. Rigutto, F. Fortes, N. Saraiva, J. Kiguli, J. Kyomuhendo, M. Francis, F. Noël, M. Mulemba, and S. Balkan, “High efficacy of two artemisinin-based combinations (artesunate + amodiaquine and artemether + lumefantrine) in Caala, Central Angola,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 75, no. 1, pp. 143–145, 2006.
- [74] M. M. Plucinski, E. Talundzic, L. Morton, P. R. Dimbu, A. P. Macaia, F. Fortes, I. Goldman, N. Lucchi, G. Stennies, J. R. MacArthur, and V. Udhayakumar, “Efficacy of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated malaria in children in Zaire and Uíge Provinces, angola.,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 1, pp. 437–43, 2015.
- [75] WHO, “Status report on artemisinin and ACT resistance September 2015,” *World Heal. Organ.*, no. September, pp. 1–8, 2015.
- [76] M. M. Plucinski, P. R. Dimbu, A. P. Macaia, C. M. Ferreira, C. Samutondo, J. Quivinja, M. Afonso, R. Kiniffo, E. Mbounga, J. S. Kelley, D. S. Patel, Y. He, E. Talundzic, D. O. Garrett, E. S. Halsey, V. Udhayakumar, P. Ringwald, and F. Fortes, “Efficacy of artemether–lumefantrine, artesunate–amodiaquine, and dihydroartemisinin–piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Angola, 2015,” *Malar. J.*, vol. 16, no. 1, p. 62, 2017.
- [77] B. E. Gama, G. a L. Pereira-Carvalho, F. J. I. Lutucuta Kosi, N. K. Almeida de Oliveira, F. Fortes, P. J. Rosenthal, C. T. Daniel-Ribeiro, and M. de Fátima Ferreira-da-Cruz, “*Plasmodium falciparum* isolates from Angola show the StctVMNT haplotype in the *pfert* gene.,” *Malar. J.*, vol. 9, p. 174, Jan. 2010.
- [78] C. Fancony, M. Brito, and J. P. Gil, “*Plasmodium falciparum* drug resistance in Angola.,” *Malar. J.*, vol. 15, no. 1, p. 74, 2016.
- [79] V. E. Pinheiro, L. Franco, S. Adagu, I G, Rosa, R, Do Rosário and D. C. WARHURST, “DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DUPLA 86 TYR E 1246 TYR no gene *pfmdr1* em clones de uma amostra de *Plasmodium falciparum* da África Ocidental , resistente à cloroquina,” *Acta Med. Port.*, vol. 16, pp. 229–233, 2003.
- [80] P. Figueiredo, C. Benchimol, D. Lopes, L. Bernardino, V. E. do Rosario, L. Varandas, and F. Nogueira, “Prevalence of *pfmdr1*, *pfert*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola,” *Malar. J.*, vol. 7, no. 1, p. 236, Jan. 2008.

- [81] V. Foumane Ngane, J. Allico Djaman, C. Culeux, N. Piette, P. Carnevale, P. Besnard, F. Fortes, L. K. Basco, and R. Tahar, “Molecular epidemiology of drug-resistant *Plasmodium falciparum* in Benguela province, Angola,” *Malar. J.*, 2015.
- [82] M. Venkatesan, N. B. Gadalla, K. Stepniewska, P. Dahal, C. Nsanzabana, C. Moriera, R. N. Price, A. Mårtensson, P. J. Rosenthal, G. Dorsey, C. J. Sutherland, P. Guérin, T. M. E. Davis, D. Ménard, I. Adam, G. Ademowo, C. Arze, F. N. Baliraine, N. Berens-Riha, A. Björkman, S. Borrmann, F. Checchi, M. D. M. Dhorda, A. a Djimdé, B. B. El-Sayed, T. Eshetu, F. Eyase, C. Falade, J.-F. Faucher, G. Fröberg, A. Grivoyannis, S. Hamour, S. Houzé, J. Johnson, E. Kamugisha, S. Kariuki, J.-R. Kiechel, F. Kironde, P.-E. K. J. LeBras, M. Malmberg, L. Mwai, B. Ngasala, F. Nosten, S. L. Nsobia, A. N. M. Oguike, S. D. Otienoburu, B. Ogutu, J.-B. Ouédraogo, P. Piola, L. Rombo, B. Schramm, a F. Somé, J. Thwing, J. Ursing, R. P. M. Wong, A. Zeynudin, I. Zongo, C. V Plowe, and C. H. Sibley, “Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter and Multidrug Resistance 1 Genes: Parasite Risk Factors that Affect Treatment Outcomes for *P. falciparum* Malaria after Artemether-Lumefantrine and Artesunate-Amodiaquine,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 91, no. 4, pp. 833–843, Oct. 2014.
- [83] B. Witkowski, M.-L. Nicolau, P. N. Soh, X. Iriart, S. Menard, M. Alvarez, B. Marchou, J.-F. Magnaval, F. Benoit-Vical, and A. Berry, “*Plasmodium falciparum* isolates with increased *pfmdr1* copy number circulate in West Africa,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 7, pp. 3049–51, Jul. 2010.
- [84] S. Menard, I. Morlais, R. Tahar, C. Sayang, P. I. Mayengue, X. Iriart, F. Benoit-Vical, B. Lemen, J.-F. Magnaval, P. Awono-Ambene, L. K. Basco, and A. Berry, “Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* drug susceptibility at the time of the introduction of artemisinin-based combination therapy in Yaoundé, Cameroon: implications for the future,” *Malar. J.*, vol. 11, no. 1, p. 113, Jan. 2012.
- [85] C. H. Vaughan-Williams, J. Raman, E. Raswiswi, E. Immelman, H. Reichel, K. Gate, and S. Knight, “Assessment of the therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in northern KwaZulu-Natal: an observational cohort study,” *Malar. J.*, vol. 11, no. 1, p. 434, Jan. 2012.
- [86] D. R. Pillai, R. Lau, K. Khairnar, R. Lepore, A. Via, H. M. Staines, and S. Krishna, “Artemether resistance in vitro is linked to mutations in PfATP6 that also interact with mutations in PfMDR1 in travellers returning with *Plasmodium falciparum* infections,” *Malar. J.*, vol. 11, pp. 1–9, 2012.
- [87] M. Labadie-Bracho and M. R. Adhin, “Increased *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* isolates from Suriname,” *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 18, no. 7, pp. 796–799, Jul. 2013.
- [88] M. Menegon, R. J. Pearce, W. O. Inojosa, V. Pisani, P. M. Abel, A. Matondo, Z. Bisoffi, G. Majori, R. Ord, D. C. Warhurst, C. Roper, and C. Severini, “Monitoring for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates and analysis of pyrimethamine resistance evolution in Uige province, Angola,” *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 14, no. 10, pp. 1251–1257, Oct. 2009.
- [89] C. T. Happi, G. O. Gbotosho, O. A. Folarin, A. Sowunmi, T. Hudson, M. O’Neil, W. Miihous, D. F. Wirth, and A. M. J. Oduola, “Selection of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by artemether-lumefantrine in nigerian children with uncomplicated



- falciparum malaria,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 3, pp. 888–895, 2009.
- [90] L. Cui, S. Mharakurwa, D. Ndiaye, P. K. Rathod, and P. J. Rosenthal, “Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 93, no. 3 Suppl, pp. 57–68, 2015.
- [91] M. H. Nyunt, T. Hlaing, H. W. Oo, L. L. K. Tin-Oo, H. P. Phway, B. Wang, N. N. Zaw, S. S. Han, T. Tun, K. K. San, M. P. Kyaw, and E. T. Han, “Molecular assessment of artemisinin resistance markers, polymorphisms in the K13 propeller, and a multidrug-resistance gene in the Eastern and Western Border Areas of Myanmar,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 60, no. 8, pp. 1208–1215, 2015.
- [92] C. Escobar, S. Pateira, E. Lobo, L. Lobo, R. Teodosio, F. Dias, N. Fernandes, A. P. Arez, L. Varandas, and F. Nogueira, “Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* K13-Propeller in Angola and Mozambique after the Introduction of the ACTs,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0119215, 2015.
- [93] E. Kamau, S. Campino, L. Amenga-Etego, E. Drury, D. Ishengoma, K. Johnson, D. Mumba, M. Kekre, W. Yavo, D. Mead, M. Bouyou-Akotet, T. Apinjoh, L. Golassa, M. Randrianarivelojosia, B. Andagalu, O. Maiga-Ascofare, A. Amambua-Ngwa, P. Tindana, A. Ghansah, B. Macinnis, D. Kwiatkowski, and A. A. Djimde, “K13-propeller polymorphisms in *plasmodium falciparum* parasites from sub-saharan Africa,” *J. Infect. Dis.*, vol. 211, no. 8, pp. 1352–1355, 2015.
- [94] H.-G. Xie and F. W. Frueh, “Pharmacogenomics steps toward personalized medicine,” *Per. Med.*, vol. 2, no. 4, pp. 325–337, 2005.
- [95] E. Aklillu, M. Oscarson, M. Hidestrand, B. Leidvik, C. Otter, and M. Ingelman-Sundberg, “Functional analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 61, no. 3, pp. 586–594, 2002.
- [96] K. J. Marwa, T. Schmidt, M. Sjögren, O. M. S. Minzi, E. Kamugisha, and G. Swedberg, “Cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms in an indigenous Tanzanian population: a concern about the metabolism of artemisinin-based combinations,” *Malar. J.*, vol. 13, p. 420, Jan. 2014.
- [97] G. Korytina, O. Kochetova, L. Akhmadishina, E. Viktorova, and T. Victorova, “Polymorphisms of cytochrome p450 genes in three ethnic groups from Russia,” *Balkan Med. J.*, vol. 29, no. 3, pp. 252–60, 2012.
- [98] A. H. Salem, M. Ali, A. Ibrahim, and M. Ibrahim, “Genotype and Allele Frequencies of MDR-1 Gene Polymorphism in Jordanian and Sudanese Populations,” *Am. J. Med. Stud.*, vol. 2, no. 1, pp. 19–23, 2014.
- [99] I. Cavaco, J. P. Gil, E. Gil-Berglund, and V. Ribeiro, “CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 41, no. September 2002, pp. 1345–1350, 2003.
- [100] C. Kimchi-Sarfaty, A. H. Marple, S. Shinar, A. M. Kimchi, D. Scavo, M. I. Roma, I.-W. Kim, A. Jones, M. Arora, J. Gribar, D. Gurwitz, and M. M. Gottesman, “Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene,” *Pharmacogenomics*, vol. 8, no. 1, pp. 29–39, 2007.
- [101] G. D. Leschziner, T. Andrew, M. Pirmohamed, and M. R. Johnson, “ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research,” *Pharmacogenomics J.*, vol. 7, no. 3, pp. 154–179, 2007.
- [102] J. Mills, K. Rose, and N. Sadagopan, “Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,

- vol. 309, no. 1, pp. 303–309, 2004.
- [103] R. F. Mutagonda, A. A. R. Kamuhabwa, O. M. S. Minzi, S. N. Massawe, M. Asghar, M. V. Homann, A. Färnert, and E. Aklillu, “Effect of pharmacogenetics on plasma lumefantrine pharmacokinetics and malaria treatment outcome in pregnant women,” *Malar. J.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, 2017.

## **VII. Glossário**

**Associação terapêutica:** administração simultânea de dois ou mais fármacos, seja em preparações separadas seja numa mesma preparação.

**Citocromo P450:** (abreviado CYP, P450 ou CYP450) é uma superfamília ampla e diversificada de proteínas responsáveis por oxidar um grande número de substâncias para torná-las mais polares e hidrossolúveis.

**Clone:** Progenia de um único parasita, normalmente obtido por manipulação ou diluições sucessivas de uma mistura de parasitas, originária de um único isolado mantido em laboratório por cultura contínua *in vitro* Exemplo: Dd2, 3D7, clones de referência para estudos de resistência aos antimaláricos.

**Diploide:** célula ou organismo que contem duas cópias de cada cromossoma, normalmente uma materna e outra paterna.

**Efeitos adversos ou colaterais:** efeitos normalmente não desejados que se apresentam no Homem como resultado da administração de fármaco ou combinação.

**Enzimas de restrição:** ou endonucleases são enzimas que cortam DNA de cadeia dupla. A enzima introduz uma incisão em cada cadeia da dupla hélice sem danificar as bases nitrogenadas, as ligações químicas que estas enzimas interrompem podem ser restabelecidas por ligases.

**Equilíbrio de Hardy-Weinberg:** é a base da genética de populações, afirma que, em uma população mendeliana, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. Independentemente de um gene ser raro ou frequente, sua frequência permanecerá a mesma com relação aos outros desde que essas condições sejam mantidas.

**Esporogonia:** fase de desenvolvimento do ciclo de vida do plasmódio que ocorre no mosquito vetor.

**Esquizogonia:** fase de desenvolvimento do ciclo de vida do plasmódio que ocorre nos hepatócitos (esquizogonia tecidular) e nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica).

**Farmacocinética:** ciência que estuda a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos.

**Farmacogenética:** Estudo da variação individual ou populacional da absorção e metabolização dos fármacos, ligada a genes.

**Gene:** Segmento de uma molécula de DNA que codifica a síntese de um polipéptido completo.

**Genoma:** material genético de uma célula, corresponde ao conjunto de todos os genes que um dado organismo contem nos seus cromossomas e no genoma mitocondrial.

**Haploide:** célula ou organismo que contem uma cópia de cada cromossoma, entre os organismos mais desenvolvidos apenas as células reprodutoras são haplóides, durante a reprodução estas fundem-se dando origem ao zigoto.

**Heterozigótico:** indivíduo que tem dois alelos diferentes do mesmo gene. Cada indivíduo possui dois alelos de cada gene, sendo que cada alelo fica em um dos dois cromossomos homólogos.

**Homozigótico:** indivíduo com alelos idênticos presentes num determinado *locus* genético. Um indivíduo é chamado de homozigótico, quando os alelos que codificam uma determinada característica são iguais.

**Infeção:** Penetração, desenvolvimento e/ou multiplicação de um organismo num hospedeiro.

**Infetante:** Que pode causar infeção.

**Isolado:** Amostra de sangue infetado por *Plasmodium falciparum*, que pode conter mais do que uma população parasitária.

**Mutações:** são alterações na sequência dos nucleótidos do material genético de um organismo.

**Nucleótidos:** são as unidades constituintes dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). Um nucleótido é uma associação entre uma base (purina ou pirimidina), uma ribose ou desoxirribose (RNA ou DNA respetivamente) e uma molécula de ácido fosfórico.

**Parasitémia:** Presença de parasitas no sangue.

**Resistência:** Capacidade de uma estirpe de parasitas para sobreviver e se multiplicar na presença de um agente antimalárico, em concentrações que normalmente destroem ou impedem a sua multiplicação.



## Anexo II.1. Aprovação do Comité de Ética do Ministério da Saúde de Angola



### Parecer do Comité de Ética

Parecer sobre o protocolo de estudo designado «**Diversidade dos genes CYPs, MDR1, CAR e PXR e do seu papel na metabolização dos ACTs em Doentes com Malária por *plasmodium falciparum***», submetido a este Comité pelo Dr<sup>o</sup> **Kinanga Kiaco**, médico epidemiologista da Direcção dos Serviços de Saúde das Forças Armadas Angolanas, e inscrito na ordem dos médicos com o n<sup>o</sup> 1697.

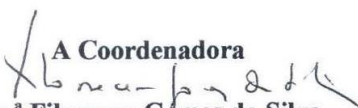
Na apreciação do protocolo em referência o Comité de Ética constatou que se trata de um estudo que visa investigar principalmente, os factores do hospedeiro humano relacionados com a perda da eficácia terapêutica aos antimaláricos.

O Comité verificou que no estudo, os aspectos éticos estão salvaguardados no que refere a voluntariedade dos participantes ou dos seus responsáveis após consentimento informado, a confidencialidade dos resultados e a garantia de assistência médica e medicamentosa. Também está assegurada a aplicação das normas de biossegurança na colheita, manipulação e acondicionamento das amostras biológicas.


O Comité constatou ainda que a metodologia a seguir no estudo para a colheita e preparação das amostras de sangue, assim como a leitura registo e interpretação dos resultados obedecem as normas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde em estudos de resistência aos antimaláricos e que os antimaláricos seleccionados se baseiam no regime terapêutico actualmente utilizado em Angola no tratamento da Malária não complicada.

O estudo vai ainda contribuir para o aperfeiçoamento técnico profissional do pessoal da saúde nele envolvido nas áreas do diagnóstico por biologia molecular, e para a melhoria dos regimes terapêuticos para a Malária, pelo que, o Comité, considera não haver inconveniente que se realize no País.

Luanda aos 17 de Março 2011.

  
**A Coordenadora**  
**Dr.ª Filomena Gomes da Silva**  
**“BIÓLOGA”**

**Anexo II.2.** Autorizações éticas das instituições envolvidas nas colheitas

  
**Forças Armadas Angolanas**  
**Estado Maior General**  
*Direcção dos Serviços de Saúde*

Ao  
**Conselho Científico do Instituto de  
Higiene e Medicina Tropical da  
Universidade Nova de Lisboa**  
**Lisboa**

N/Referência      V/Comunicação      N/Referência      N/Comunicação  
                                         189 / 5.11/RPO/DSS/EMG/09      29/06/09

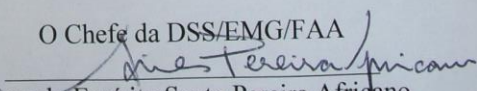
**Assunto: “Anuência para a realização do Projecto de Investigação”**

**Excelência**

A Direcção dos Serviços de Saúde do Estado Maior General das FAA, **Declara** que o **Doutor Kinanga Kiaco**, Licenciado em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto, Especialista em Epidemiologia pela Academia de Medicina Militar de Belgrado/Jugoslavia, tem a anuência desta instituição para a realização do Projecto de Investigação, inerente ao processo conducente a obtenção do Doutoramento.

Sem outro assunto de momento, subscrevemo-nos,

Atenciosamente

O Chefe da DSS/EMG/FAA  
  
Aires do Espírito Santo Pereira Africano  
“ Tenente General – Médico ”



### Anexo II.3. Declaração de consentimento para inclusão no estudo

#### MODELO DE CONSENTIMENTO PARA O ESTUDO

**ESTUDO DA DIVERSIDADE DOS GENES CYPs, MDR1, CAR E PXR E DO SEU PAPEL NA METABOLIZAÇÃO DOS ACTs EM DOENTES COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM***

Referência/identificação: 01

Tendo tido conhecimento deste estudo, eu abaixo assinado(a), paciente (ou responsável pela criança) com o nome de Alfonso de Souza,  
concordo em participar voluntariamente neste estudo, pelo que me comprometo a comparecer ou trazer a criança nas datas que me forem indicadas, durante o período do estudo. Embora a participação seja voluntária, poderei em qualquer momento interromper a minha colaboração. A não aderência ou a interrupção do estudo, não significa que a criança não seja tratada convenientemente e com todos os meios que o investigador dispõe.

Data: 04/09/12

O paciente ou responsável pela criança: [assinatura]

## Anexo II.4. Ficha de registo dos resultados da MO durante o seguimento

### FICHA DE REGISTO LABORATORIAL

#### ESTUDO DA DIVERSIDADE DOS GENES CYPs, MDR1, CAR E PXR E DO SEU PAPEL NA METABOLIZAÇÃO DOS ACTS EM DOENTES COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Nº de identificação \_\_\_\_\_

Nome do doente \_\_\_\_\_

Residência \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Município \_\_\_\_\_

Contacto telefónico \_\_\_\_\_

Data Nº da lâmina G.E. Dia0 G.EDia3 G.E.Dia7 G.E.Dia14 G.E.Dia21 G.E.Dia28

Data/dia	Gota Espessa	Resultado

# Anexo II.5. Dose da combinação AL (Coartem®) por kg de peso corporal

Peso do paciente (kg)	Número de comprimidos/dose	Artemeter + lumefantrina
5 - <15	1	20 mg + 120 mg
15 – 24	2	40 mg + 240 mg
25- 34	3	60 mg + 360 mg
>34	4	80 mg + 480 mg

**Anexo II.6.** Ficha de avaliação clínica dos doentes incluídos no estudo para seguimento**FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA DO DOENTE E SEGUIMENTO****ESTUDO DA DIVERSIDADE DOS GENES CYPs, MDR1, CAR E PXR E DO SEU PAPEL NA METABOLIZAÇÃO DOS ACTs EM DOENTES COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM***

Nome do Paciente \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Peso/kg \_\_\_\_\_

Residência \_\_\_\_\_

Parametros	Nome do Paciente _____, Idade _____, Peso/kg _____						
	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 7	8.DIA 14	DIA 28
Data							
1. Temperatura axilar (°C)							
2. Tratamento							
3. Dose de antimalárico							
4. Vomitou (após a medicação) (SIM;NÃO)							
5. Sinais nas ultimas 24h (vómitos, convulsões, inconsciência, diarreia, outros)							
6. Colheita de sangue para papel de filtro							
7. Número da Lamina							
8.1ª Leitura (rápida)							
9.2ª Leitura (parasitas/glóbulos brancos)							
10. Densidade parasitária (parasitas/ $\mu$ l)							
11. % Densidade em Relação ao D0							
12. Concentração plasmática dos Fármacos							
13. Hemoglobina (g/l)							
14. Outras patologias evidentes							
15. Outros tratamento que necessita							
16. Razão do abandono							
17. Conclusão clínica							
18. OBSERVAÇÕES							

Nome do médico responsável pelo estudo \_\_\_\_\_

Nome do enfermeiro responsável \_\_\_\_\_

Nome do técnico do laboratório responsável pela análise laboratorial \_\_\_\_\_

Contacto do responsável pelo estudo: \_\_\_\_\_

**Anexo II.7.** Parâmetros da validação do HPLC

Critério de validação de um método		
1	Especificidade	Capacidade do método analítico em detetar o(s) compostos (s) de interesse na presença de outros componentes da matriz.
2	Linearidade	Determina a faixa de concentrações do composto na qual o método pode ser aplicado, sendo os limites de deteção determinados pelo primeiro e último valores da faixa.
3	Sensibilidade	Parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da do gradiente de concentração do composto analisado; a sensibilidade depende da natureza do composto e da técnica de deteção utilizada.
4	Limiares analíticos	Valores que indicam a capacidade de deteção e quantificação do método; este parâmetro é determinado pelos limites inferiores da curva de calibração.
5	Precisão	Avaliação da proximidade dos resultados obtidos numa série de medidas da uma mesma amostra; os resultados são validados por métodos de repetibilidade e de reprodutibilidade.
6	Exatidão	Valor obtido em relação ao valor verdadeiro esperado ou estipulado, de acordo com as condições padronizadas.
7	Robustez	Parâmetro que mede a sensibilidade do método, face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. [38]
8	Coerência	Expressa a concordância de valores obtidos quando são introduzidas variações aleatórias nas condições experimentais do método.

**Anexo II.8. - Reagentes e solventes utilizados no HPLC**

Tipo	Designação	Fornecedor	Referência
Reagente	Acetonitrilo	VWR	83.639.320
Reagente	Clorofórmio	VWR	83.626.290
Reagente	Metanol	VWR	20.864.320
Reagente	Acido acético	Sigma-Aldrich	695092-2.5L
Reagente	Acido trifloro acético	VWR	8.082.600.100
Reagente	Dihidrogenio fosfato de sódio	VWR	26.936.293
Reagente	Acido orto fosfórico	VWR	153154D
Reagente	Acido per clorídrico	ViaAthena	96.530.500
Reagente	Acetato de amónia	VWR	21.200.297
Reagente	Acido hidroclicoridrico	VWR	20.252.335
Reagente	Acido tartárico	VWR	8.433.770.100
Padrão	Lumefantrina (LF)	VWR	USPH1370746
Padrão	artemeter (ART)	VWR	CAYM11815-1
Padrão interno	Halofantrina (IS)	Sigma-Aldrich	H9414-50MG

**Anexo IV.1. Eficácia terapêutica da combinação em diferentes países da região africana.**  
**Fonte: WHO Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.**

País	Período de estudos	Nº de estudos	Taxas de falência terapêutica		
			Média	Mínima	Máxima
Angola	2013 – 2013	2	7.2	2.7	11.7
Angola	2015	3	10.4	0.0	24
Benim	2005 - 2011	6	0.8	0.0	6.5
Burquina Faso	2005 - 2012	9	6.2	0.0	12.5
Camarões	2006 - 2013	12	1.9	0.0	5.0
R. Centro Africana	2008 - 2010	2	3.8	0.0	7.6
Congo	2006 - 2014	3	2.8	0.0	3.6
Côte d'Ivoire	2005 - 2014	12	1.5	0.0	7.4
R.D. Congo	2005 - 2013	15	1.6	0.0	9.2
Etiópia	2006 - 2013	18	1.2	0.0	7.5
Gabão	2007 - 2015	3	1.4	0.0	5.7
Gana	2005 - 2013	13	1.7	0.0	13.8
Gambia	2007 -2013	7	0	1,6	11,9
Guiné Bissau	2006 - 2008	1	3.6	3.6	3.6
Quênia	2005 - 2011	16	1.7	0.0	6.6
Malawi	2005 - 2012	8	4.5	0.0	19.5
Moçambique	2005 - 2012	9	3.1	0.0	5.8
Nigéria	2005 - 2011	17	2.3	0.0	12.7
Zâmbia	2005 - 2012	12	0.0	0.0	6.7
Zimbabwe	2006 - 2014	34	2.2	0.0	14.3

**Anexo IV.2.** Frequências genotípicas dos SNP's analisados, encontradas em diferentes estudos realizados em Angola e noutros países

Autor / ano	n.	Frequências Genotípicas											
		<i>Pfmdr1</i>						<i>Pfatp6</i>		<i>Pfk13</i>			
		<i>N86Y</i>		<i>D1246Y</i>		<i>cópias</i>		<i>S769N</i>		<i>Y493H</i>	<i>R539T</i>	<i>I543T</i>	<i>C580Y</i>
		<i>N</i>	<i>YY</i>	<i>NY</i>	<i>D</i>	<i>Y</i>	<i>&gt;</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>Wt</i>	<i>Wt</i>	<i>wt</i>	<i>Wt</i>
Presente estudo	103	73,4	18,1	8,5	99,0	1,0		100	0	100	100	100	100
Pinheiro, 2003	15	27	73		100	0							
Figueiredo, Luanda, 2007	245	29	61	10									
Menegon et al, Uíge, 2004	66	32	36	32				100	0				
Gama et al, Luanda, 2007	114	61	11	21	100	0							
Fancony et al, Bengo, 2010	541	68	17	15									
Ngane et al, Benguela, 2010/2011	54	35	48	17	98,2	1,8							
Plucinski et al, Uíge e Zaire, 2013	25									100	100	100	100
Escobar et al, 2003-2010	100									100	100	100	100
África de Leste	203	42	34	14	45	25	2						
	3												
África de Oeste	132	37	44	19	77	11	NA						
	1												
Ásia e Oceânia	226	71	0	39	87	0	50						



**Anexo IV.3.** Frequências alélicas dos SNP's analisados e comparação com a resposta terapêutica a AL.

Treatment outcome	SNPs									pfmdr1 >cópias
	pfmdr1 86			pfmdr1 1246		pfatp6 769		pfK13		
	N86	86Y	86N+Y	D1246	1246Y	S769	769N	Wt	Mut	
ACPR	74.1% (n=63)	17.6% (n=15)	8.2% (n=7)	99% (n=88)	1% (n=1)	100% (n=93)	0	100% (n=12)	0	13% (n=12/92)
Treatment failure	66.6% (n=6)	22.2% (n=2)	11.1% (n=1)	100 (n=7)	0	100% (n=10)	0	100% (n=9)	0	11% (n=1/9)
Total (n)	69	17	8	95	1	103	0	21	0	13
P<0,05	X2=0,117, p=0,732	X2=0,163, p=0,686	X2=0,177, p=0,676	X2=0,003, p=0,960		X2=0,000, p=1			X2=0,117, p=0,732	X2=0,029 p=0,865

**Anexo IV.4.** Frequências de genótipos dos SNP's analisados, em diferentes países.

País	SNP / frequência alélica										
	<i>MDR1</i>		<i>CYP3A4</i>		<i>CYP3A5</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>CPY1B1</i>		<i>CYP2C8</i>		
	<i>3435TT</i>	<i>129TT</i>	<i>*1B</i>	<i>*2</i>	<i>*3</i>	<i>*2B</i>	<i>*3</i>	<i>*5</i>	<i>*2</i>	<i>*3</i>	<i>*4</i>
Africanos					33						
Caucasianos					82-95						
Asiáticos					75						
<b>Neste estudo</b>	<b>12,9</b>	<b>10,6</b>	<b>71,7</b>	<b>0</b>	<b>14,3</b>	<b>1,2</b>	<b>24,8</b>	<b>4,6</b>	<b>18,3</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
Angola											
Argélia											
África do Sul											
Burkina Faso											
Cameron									15	3	
Congo											
Etiópia							39				
Gana									17	0	
Guiné Bissau										0	
Quênia											
Mali						24?					
Marco											
Moçambique									16	0	0,5
Namíbia						4,9					
Nigéria					6	24?					
Tanzânia						1,2			14		
Uganda											
Senegal									22		
Sudão											
Zâmbia							39				
Zanzibar						2,4			14	2,2	0,6
Zimbabwe											

**Anexo IV.5.** Associação entre as frequências genotípicas dos SNP's analisados e as parasitemia no D3

Gene/SNP	(f%; IC 95%)					
	PCR positivo D3			PCR negativo D3		
	Tipo selvagem	Heterozigótico	Mutante	Tipo selvagem	Heterozigótico	Mutante
<b><i>CYP3A4*1B</i></b>	3/48 (62;1,6-18,2)	14/48 (29,2; 17,4-44,3)	31/48 (64,6; 44,0-7,75)	8/49 (0.163; 0.078-0.302)	21/49 (42,9; 29,1-57,7)	20/49 (40,8; 27,0-55,8)
<b><i>CYP3A4*2</i></b>	48/48 (100)	0	0	53/53 (100)	0	0
<b><i>CYP3A5, 6986A&gt;G</i></b>	35/44 (79,5; 72,6 -85,8)	8/44 (41,1; 29,4 -55,6)	1/44 (2,3; 0,11 -7,4)	28/39 (71,7; 62,5 -79,9)	8/39 (20,5; 13,3 -28,9)	3/39 (7,7; 3,9 -15,2)
<b><i>MDR1, 3435C&gt;T</i></b>	34/47 (72,3;57,1-83,9)	9/47 (19,2; 9,7-33,7)	4/47 (8,5; 2,8-21,3)	41/51 (80,4; 66,5-89,7)	7/51 (13,7; 6,2-26,9)	3/51 (5,9; 1,5-17,2)
<b><i>MDR1, -129T&gt;C</i></b>	38/47 (80,8; 72,1-87,6)	8/47 (17; 10,8-25,6)	1/47 (2,1;	41/51 (80,4; 71,0-86,7)	10/51 (19,6; 13,2-29,0)	0/51 (0)

**Anexo IV.6.** Estudo da associação das frequências genotípicas do SNP's analisados e a recorrência no período de seguimento (28 dias)

Gene/SNP	N (f%; IC 95%)					
	Sem recorrência			Parasitémia recorrente		
	Tipo selvagem	Heterozigótico	Mutante	Tipo selvagem	Heterozigótico	Mutante
<b><i>CYP3A4*1B</i></b>	8/71 ( <b>11,3</b> ; 5,3-21,5)	37/71 ( <b>52,1</b> ; 40,0-64,0)	26/71 ( <b>36,6</b> ; 25,8-49,0)	3/28 ( <b>10,7</b> ; 2,8-29,4)	10/28 ( <b>35,7</b> ; 19,3-55,9)	15/28 ( <b>53,6</b> ; 34,2-72,0)
<b><i>CYP3A4*2</i></b>	74/74 (100)	0	0	29/29 (100)	0	0
<b><i>CYP3A5*3</i></b>	46/59 ( <b>78,0</b> ; 65,3-87,7)	11/59 ( <b>18,6</b> ; 9,7-30,9)	2/59 ( <b>3,4</b> ; 0,4-11,7)	17/25 ( <b>68,0</b> ; 46,5-85,1)	6/25 ( <b>24,0</b> ; 9,4-45,1)	2/25 ( <b>8,0</b> ; 1,0-26,0)
<b><i>MDR1, 3435C&gt;T</i></b>	60/72* ( <b>83,3</b> ; 72,3-90,7)	10/72* ( <b>7,7</b> ; 7,2-24,5)	2/72* ( <b>2,8</b> ; 0,5-10,6)	17/29* ( <b>58,6</b> ; 39,1-76,0)	6/29* ( <b>20,7</b> ; 8,7-40,3)	6/29* ( <b>20,7</b> ; 8,7-40,3)